

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTREAL

L'OCYTOCINE, L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET LES MAP-KINASES DANS LA
DIFFÉRENCIATION MÉSODERMIQUE DE CELLULES SOUCHES
EMBRYONNAIRES P19

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
FRÉDÉRIC BOUCHARD

AOÛT 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier ma directrice de recherche la Dre Joanne Paquin pour son soutien, sa confiance et sa patience tout au long de ces années de doctorat. Merci d'avoir continuellement cru en moi et de m'avoir encouragé dans les moments plus difficiles. Les travaux qui ont permis la rédaction de cette thèse sont le fruit de discussions scientifiques avec vous ainsi que vos nombreux conseils. Merci de m'avoir secondé dans les processus de rédaction et de révision des articles scientifiques et de la thèse.

De nombreuses personnes sont passées dans le laboratoire tout au long de ces années. Je désire tout d'abord remercier Philippe Ducharme, qui par sa présence quotidienne, son soutien, son écoute et surtout son amitié m'a permis de traverser les années menant à l'écriture de cette thèse. Je désire aussi remercier Josianne Gagné, Mylène Paradis et Houda Salmi qui ont, chacune à leur manière, rendu l'ambiance du laboratoire amicale et chaleureuse.

Je veux aussi remercier les nombreux collaborateurs qui m'ont permis d'avancer sur le plan scientifique. Je remercie les Drs Mircea-Alexandru Mateescu, Isabelle Marcotte et Borhane Annabi (UQAM) ainsi que leurs étudiants Frédéric Byette, Marc Lemieux et Sébastien Proulx-Bonneau. Plusieurs solutions, idées et avancements sont le fruit de discussions scientifiques formelles et informelles avec Philippe Ducharme, Marc Lemieux, Elias Assad et Hugo Lachance, et je les en remercie. Votre disponibilité et votre écoute m'ont été précieuses.

L'écriture de cette thèse est le résultat de plusieurs années de travail acharné ponctué de bons et de mauvais moments. J'exprime toute ma gratitude à Catherine, ma conjointe, qui a su faire preuve de patience et m'a appuyé toutes ces années. La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans elle !

Un merci spécial va aux membres de ma famille qui ont toujours cru en moi et m'ont toujours soutenu et encouragé. Merci à mes parents, Jeanne et Raynald, et à ma sœur

Lysianne. Je veux aussi saluer mes nièces Alexya et Zoé qui malgré leur jeune âge sont une source d'inspiration continuelle pour moi. Aujourd'hui, je suis fier de partager avec les membres de ma famille le fruit de tous mes efforts puisque c'est en partie grâce à eux que j'ai pu me rendre jusqu'ici.

Finalement je remercie les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), la Fondation UQAM et le centre de recherche Pharmaqam pour leur soutien financier sans lequel cette étude n'aurait pu être réalisée.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
RÉSUMÉ.....	xvi
INTRODUCTION.....	1
PARTIE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	3
CHAPITRE I	
ASPECTS DU DEVELOPPEMENT PRENATAL	4
1.1 Généralités.....	4
1.2 Développement de l'embryon.....	4
1.2.1 La formation du blastocyste, la nidation et la gastrulation	4
1.2.2 L'organogenèse.....	5
1.3 Développement mésodermique.....	6
1.3.1 La somitogenèse.....	7
1.3.2 La squelettomyogenèse	7
1.3.3 La formation du myocarde	9
1.3.4 La génération du tissu adipeux et les autres organes mésodermiques.....	12
CHAPITRE II	
LES CELLULES SOUCHES	14
2.1 Définition et types	14
2.2 Cellules souches naturelles : embryonnaires et somatiques	14
2.3 Le modèle de cellules souches embryonnaires P19.....	15
2.4 Les cellules souches induites (IPS).....	17
2.5 Les types de cellules souches et la médecine régénératrice.....	17
2.5.1 La régénération cardiaque par les cellules souches.....	19
2.6 Facteurs et mécanismes de différenciation <i>in vitro</i> des cellules souches	20
CHAPITRE III	
L'OCYTOCINE (OT) COMME AGENT DE DIFFÉRENCIATION	23
3.1 Structure et biosynthèse de l'OT	23
3.2 Différents rôles et mécanismes d'action.....	25
3.3 Rôles de l'OT dans le cœur et la différenciation cardiaque.....	25
3.3.1 Les raisons de l'intérêt pour l'OT comme agent cardiomyogénique	26

3.3.2 Démonstration de l'action cardiomyogénique de l'OT	26
CHAPITRE IV	
L'ACIDE RÉTINOÏQUE (AR) COMME AGENT DE DIFFÉRENCIATION	28
4.1 Importance et source de l'AR et autres rétinoïdes	28
4.2 Métabolisme et action intracellulaire de l'AR.....	29
4.3 Action nucléaire des rétinoïdes.....	31
4.4 La voie non-génomique de l'action de l'AR.....	31
4.5 Les rétinoïdes dans la différenciation cellulaire	32
CHAPITRE V	
LES MAPK.....	33
5.1 Généralités.....	33
5.2 ERK1 et 2.....	34
5.3 P38	35
5.4 JNK.....	36
5.5 Les MAPK dans la différenciation de cellules souches <i>in vitro</i>	36
PARTIE II	
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	38
CHAPITRE VI	
PROJET DE RECHERCHE	39
6.1 Problématique.....	39
6.2 Hypothèse et objectifs.....	43
6.3 Approche expérimentale	43
CHAPITRE VII	
SKELETAL AND CARDIAC MYOGENESIS ACCOMPANY ADIPOGENESIS IN P19 EMBRYONAL STEM CELLS.....	47
7.1 Résumé.....	48
7.2 Abstract.....	50
7.3 Introduction	50
7.4 Materials and methods	52
7.4.1 Culture and differentiation of P19 cells.....	52
7.4.2 Polymerase chain reaction (PCR).....	53
7.4.3 Immunocytochemistry.....	54
7.4.4 Oil-Red-O staining	54
7.4.5 SDS-PAGE and immunoblotting.....	55
7.4.6 Statistics	55

7.5 Results	56
7.5.1 RA, insulin and T3 induce adipogenesis in P19 cells.....	56
7.5.2 Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis.....	56
7.5.3 Comparison of cardiomyogenesis in adipogenic and OT-based protocols.....	57
7.5.4 Comparison of skeletomyogenesis in adipogenic and OT-based protocols	57
7.5.5 Comparison of adipogenesis in adipogenic and OT-based protocols.....	58
7.5.6 Expression of Oct3/4 pluripotency marker in adipogenic and OT-based protocols	58
7.6 Discussion.....	59
7.7 Acknowledgements	61
7.8 Tables and Figures.....	62
7.9 Supplemental materials.....	71
CHAPITRE VIII	
THE RETINOID AGONISTS TTNPB AND LG100268 DIFFERENTLY MODULATE	
ADIPOGENESIS, MYOGENESIS AND THE PHOSPHORYLATION OF ERK AND P38	
MAPK IN P19 STEM CELLS	
8.1 Résumé	73
8.2 Abstract	75
8.3 Introduction	75
8.4 Materials and Methods.....	77
8.4.1 Culture and differentiation of P19-MLC2v-GFP cells	77
8.4.2 Cell proliferation assay with Crystal violet.....	78
8.4.3 Polymerase chain reaction (PCR).....	79
8.4.4 Cytofluorescence.....	79
8.4.5 Oil-Red-O staining	80
8.4.6 Gel electrophoresis and immunoblotting.....	80
8.4.7 Statistics	81
8.5 Results	81
8.5.1 Effect of retinoid ligands on cell proliferation and stemness	81
8.5.2 TTNPB is more potent than atRA in inducing adipogenesis.....	82
8.5.3 LG268 but not TTNPB induces myogenesis	83
8.5.4 Time course of ERK and P38 phosphorylation in atRA and retinoid treated cultures	84
8.5.5 Effect of the combination of atRA and MAPK inhibitors on mesodermal differentiation.....	85

8.6 Discussion.....	85
8.7 Acknowledgements:	89
8.8 Table and Figures	90
CHAPITRE IX	
RETINOIC ACID AND ERK SIGNALINGS TIMELY MODULATE THE MYOGENIC PROPERTIES OF OXYTOCIN IN P19 STEM CELLS	97
9.1 Résumé.....	98
9.2 Abstract	100
9.3 Introduction	100
9.4 Materials and Methods.....	103
9.4.1 Culture and differentiation of P19-MLC2v-GFP cells	103
9.4.2 Cytofluorescence.....	103
9.4.3 Gel electrophoresis and immunoblotting.....	104
9.4.4 Statistics	105
9.5 Results	105
9.5.1 Retinoids timely modulate the myogenic properties of OT	105
9.5.2 OT and atRA influence the phosphorylation of ERK1/2	106
9.5.3 ERK1/2 modulators influence the CM and SKM yields	106
9.6 Discussion.....	107
9.7 Acknowledgements	111
9.8 Figures.....	112
PARTIE III	
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	117
Chapitre X	
DISCUSSION.....	118
10.1 Généralités.....	118
10.2 Les cellules P19 ont un potentiel adipogénique induit par l'atRA.	120
10.3 L'atRA et ses analogues influencent la différenciation mésodermique dans les protocoles adipogénique et cardiomyogénique.....	123
10.4 Les MAPK ERK et P38 sont importantes dans les décisions mésodermiques.....	128
10.4.1 Les MAPK ERK et P38 dans l'adipogenèse	128
10.4.2 Les MAPK ERK et P38 dans la myogenèse	129
10.5 Autres perspectives	133
10.6 Conclusion.....	135

ANNEXE I	
IMPACT DES RÉTINOÏDES DANS LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE DES CELLULES P19.....	136
ANNEXE II	
CULTURE DE CELLULES P19 DANS DES ÉPONGES DE FIBROÏNE DE SOIE.....	138
ANNEXE III	
IMPACT DE HIF-1 α SUR DES MARQUEURS MYOCYTAIRES ET ADIPOCYTAIRES DANS DES CELLULES MSC.	142
ANNEXE IV	
AUTRE CONTRIBUTION	144
BIBLIOGRAPHIE.....	145

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Les feuillets embryonnaires et leurs dérivées cellulaires.....	5
1.2 Obtention de myocytes différenciés à partir de certains somites.....	8
1.3 Principales étapes de la formation du cœur.....	10
1.4 Importance de BMP dans la différenciation des cardiomyocytes.....	11
1.5 Importance de FGF dans la différenciation des cardiomyocytes.....	12
3.1 Structure primaire de l'ocytocine et la vasopressine.....	23
3.2 Biosynthèse de OT à partir de sa forme pro-OT.....	24
4.1 Résumé des fonctions variées de la vitamine A au stade adulte.....	28
4.2 Synthèse et signalisation de l'acide rétinoïque.....	30
5.1 Voies d'activation des protéines-kinases.....	33
6.1 Principaux protocoles de différenciation des cellules P19.....	44
7.1 P19 cells can differentiate into adipocytes.....	64
7.2 Contractile cells are found beside adipocytes.....	66
7.3 Adipogenic conditions generate skeletal and cardiac myocytes.....	67
7.4 Myogenesis in adipogenic and OT-based cardiomyogenic protocols.....	68
7.5 Adipogenesis in adipogenic and OT-based cardiomyogenic protocols.....	69
7.6 Downregulation of Oct3/4 pluripotency marker in adipogenic and OT-based cardiomyogenic protocols.....	70
8.1 Structure of retinoids.....	91
8.2 RAR and RXR agonists reduce the proliferation and stemness character of P19 MLC2v-GFP cells.....	92
8.3 TTNPB is a potent adipogenic retinoid.....	93
8.4 Unlike atRA and LG268, TTNPB is anti-myogenic.....	94
8.5 Time course of ERK and P38 phosphorylation in differentiating cultures.....	95
8.6 The combinations of atRA with MAPK inhibitors are adipogenic and myogenic.....	96
9.1 Overview of the cardiac differentiation procedure.....	112
9.2 Early addition of atRA or TTNPB inhibits OT-induced myogenesis.....	113
9.3 Late addition of atRA enhances OT-induced myogenesis.....	114
9.4 Time course of ERK1/2 phosphorylation in the cardiac differentiation procedure.....	115

9.5 Effect of ERK modulators on the myogenic action of the OT+atRA _L condition.	116
10.1 Résumé des principaux résultats présentés dans cette thèse	1271
10.1 Effet de l'AR sur la balance myogénique dans la différenciation de cellules souches P19	127
A.1 Importance de la fenêtre d'induction dans la différenciation neuronale	137
A.2 Images confocales de surface d'éponges de fibroïneensemencées avec des cellules P19	139
A.3 Reconstruction 3D d'images confocales d'éponges de fibroïne colonisées avec des cellules P19.....	140
A.4 Impact de l'OT et des rétinoïdes sur des MSC de souris	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Chronologie de l'organogenèse	6
2.1 Types cellulaires formés in vitro à partir de cellules souches humaines	18
2.2 Exemples d'inducteurs utilisés pour la différenciation de cellules souches.	22
6.1 État de phosphorylation requis pour ERK et P38 dans la différenciation cellulaire.	42
6.2 Marqueurs phénotypiques utilisés et leur mesure dans la caractérisation de cellules P19 et leurs dérivées	46
7.1 Semi-quantitative PCR conditions	62
7.2 qPCR conditions	63
8.1. Primers and qPCR conditions	90
10.1 Comparaison de rendements myogéniques dans le modèle cellulaire P19	132

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Adipo	(protocole) adipogénique (<i>adipogenic (protocol)</i>)
ADN	acide désoxyribonucléique
ANF	facteur natriurétique auriculaire (<i>atrial natriuretic factor</i>)
AR/RA	acide rétinoïque (<i>retinoic acid</i>)
ARN	acide ribonucléique
ATF	facteur activateur de la transcription (<i>activator transcription factor</i>)
atRA	acide <i>tout-trans</i> rétinoïque (<i>all-trans retinoic acid</i>)
BCI	<i>E-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one</i>
BMP	protéine morphogénique de l'os (<i>bone morphogenic protein</i>)
C/EBP α	protéine-alpha liant la séquence exhaustrice CCAAT (<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>)
Cardio	(protocole) cardiogénique (<i>cardiogenic (protocol)</i>)
CM	cardiomyocytes
CPC	cellules progénitrices cardiaques (<i>cardiac progenitor cells</i>)
CRABP	protéines de liaison de l'AR cellulaire (<i>cellular retinoic acid binding proteins</i>)
CRBP	protéines de liaison du rétinol cellulaire (<i>cellular retinol binding proteins</i>)
cTpnI	inhibiteur de la troponine cardiaque (<i>cardiac troponin inhibitor</i>)
CYP	cytochromes-P450
DAG	1,2-diacylglycérol
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DUSP6	phosphatase-6 de double spécificité (<i>dual specificity phosphatase 6</i>)

EC	(cellules de) carcinome embryonnaire (<i>embryonic carcinoma (cells)</i>)
EGF	facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
ERK	kinases régulées par des signaux extracellulaires (<i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
ES	(cellules) souches embryonnaires (<i>embryonic stem (cells)</i>)
FGF	facteur de croissance fibroblastique (<i>fibroblast growth factor</i>)
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase
GFP	protéine fluorescente verte (<i>green fluorescent protein</i>)
Gαq	protéine G alpha q (<i>G protein alpha q</i>)
HRP	péroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSC	cellules souches hématopoïétiques (<i>hematopoietic stem cells</i>)
Ins	insuline (<i>insulin</i>)
IP3	inositol-1,4,5-triphosphate
IPS	cellules souches pluripotentes induites (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
JNK	kinase de la terminaison NH ₂ de cJun (<i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>)
LIF	facteur inhibiteur de la leucémie (<i>leukemia inhibitory factor</i>)
L-NAME	N,G-nitro-L-arginine-méthyl-ester
LPL	Lipoprotéine-lipase
MAPK	protéine-kinases activées par des mitogènes (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
αMEM	modification alpha du milieu essentiel minimal d'Eagle (<i>alpha-modified Eagle's minimal essential medium</i>)
MHC	chaîne lourde de la myosine (<i>myosin heavy chain</i>)
MLC	chaîne légère de la myosine (<i>myosin light chain</i>)
MRF	facteur régulateur de la myogenèse (<i>myogenic regulatory factor</i>)

MSC	cellules souches mésenchymateuses (<i>mesenchymal stem cells</i>)
NI	non induit (<i>non-induced</i>)
NO	oxyde nitrique (<i>nitric oxide</i>)
NOS	synthase d'oxyde nitrique (<i>oxide nitric synthase</i>)
NP-I	neurophysine-I
Oct3/4	facteur de transcription-3/4 se liant à l'octamère (<i>octamer-binding transcription factor 3/4</i>)
OT	ocytocine (<i>oxytocin</i>)
OTA	antagoniste du récepteur de l'ocytocine (<i>oxytocin antagonist</i>)
OTR	récepteur de l'ocytocine (<i>oxytocin receptor</i>)
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	réaction de polymérase en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes (<i>platelet derived growth factor</i>)
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	Protéine-kinase C
PLC	phospholipase C
PPAR γ	récepteurs-gamma activés par des proliférateurs de peroxyosome (<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>)
qPCR	PCR quantitatif (<i>quantitative PCR</i>)
RAR	récepteurs de l'acide rétinoïque (<i>retinoic acid receptors</i>)
RARE	éléments de réponse à l'acide rétinoïque (<i>retinoic acid response elements</i>)
RBP	protéine de liaison du rétinol (<i>retinol binding protein</i>)
RE	réticulum endoplasmique
RT	transcription inverse (<i>reverse transcription</i>)

RXR	récepteurs de rétinoïdes-X (<i>retinoid-X receptors</i>)
SAPK	protéine-kinase activée par le stress (<i>stress-activated protein kinase</i>)
SDS	sodium dodécylsulfate
SKM	cellules de muscle squelettique
T3	hormone thyroïdienne T3, triiodothyronine
TBS	tampon Tris salin (<i>Tris buffer saline</i>)
TGF- β	facteurs de croissance transformants bêta (<i>transforming growth factor-beta</i>)
TTNPB	<i>E</i> -4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl] benzoic acid
VP	vasopressine

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. L'infarctus du myocarde provoque la mort d'un grand nombre de cellules cardiaques, diminuant la qualité de vie des gens qui survivent à une telle attaque. La transplantation d'un organe entier présente des limites telles que la faible quantité de donneurs et la possibilité de rejet par l'organisme du receveur. Le cœur possède une capacité de se régénérer mais le nombre de cellules souches résidentes pouvant accomplir cette tâche apparaît être insuffisant. Afin d'aider à la régénération, des approches thérapeutiques tentent l'implantation de cellules fonctionnelles dans la zone infarctée. Les cellules implantées sont, entre autres, des myoblastes squelettiques, des cellules souches embryonnaires ou adultes (cellules souches mésenchymateuses) indifférenciées, des cardiomyocytes fœtaux. Les résultats positifs parfois obtenus ont vite fait passer ces études des animaux à l'humain. La mise au point de thérapies cellulaires efficaces pour le cœur nécessite la compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant la différenciation et la morphogénèse cardiaques, et l'habileté à manipuler ces mécanismes.

Les cellules de carcinome embryonnaire P19, un modèle de cellules souches embryonnaires (ES), peuvent se différencier en cardiomyocytes lorsqu'elles sont traitées avec l'acide rétinoïque (AR) ou l'ocytocine (OT). Des cellules de muscle squelettique sont aussi générées. D'autre part, l'AR permet la différenciation de cellules ES en adipocytes et l'OT inhibe la maturation finale de pré-adipocytes. Nous avons émis l'hypothèse que l'AR et l'OT peuvent induire les cellules P19 à générer, de façon concomitante mais dans des rapports différents, des adipocytes, cardiomyocytes et cellules de muscle squelettique. De plus, des analogues de l'AR capables d'activer préférentiellement les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) ou les récepteurs de rétinoïdes-X (RXR) pourraient influencer les rapports mésodermiques. Enfin, les kinases ERK1/2 et P38, des protéines-kinases activées par des mitogènes (MAPK), pourraient avoir un rôle dans la différenciation mésodermique induite par l'AR et l'OT. Des marqueurs ont servi à identifier les phénotypes cellulaires : PPAR γ , aP2, lipoprotéines-lipase et gouttelettes lipidiques colorables à l'huile rouge pour les adipocytes; MyoD et α -actinine sarcomérique pour les cellules de muscle squelettique; troponine I cardiaque (cTnI), chaîne légère de la myosine cardiaque-2v et α -actinine sarcomérique pour les cardiomyocytes.

La culture en agrégats de cellules P19 pendant sept jours, avec une induction à l'AR entre les jours deux (J2) et J5, suivie d'une période de maturation de 20 jours en présence d'insuline et de l'hormone thyroïdienne T3 permet d'obtenir des adipocytes. Des cellules battantes exprimant l' α -actinine sarcomérique sont aussi générées. Une importante proportion de ces cellules montre la forme allongée ou fibrillaire caractéristique de myocytes squelettiques. Une faible proportion a une forme arrondie et exprime la cTnI, indiquant la génération de cardiomyocytes. L'induction des cellules P19 avec l'AR, à J2, a donc un effet mésodermique large. L'ajout d'OT au milieu de maturation n'augmente pas la proportion de cellules cardiaques par rapport aux cellules musculaires squelettiques ou aux adipocytes.

L'AR agit principalement en se liant aux RAR et RXR. Pour activer de façon spécifique chacune de ces deux familles de récepteurs, nous avons remplacé l'AR comme agent inducteur par le LG100268, un agoniste spécifique des RXR, ou par le TTNPB, un agoniste spécifique des RAR. Le LG100268 génère des adipocytes et des myocytes aussi efficacement que l'AR.

Le TTNPB est un agent adipogénique plus efficace que l'AR mais inhibe la myogenèse. Les influences mésodermiques différentes des trois agents sont associées à des actions différentes sur ERK1/2 et P38. Ainsi, l'AR et le LG100268 diminuent similairement phospho-ERK1/2 et augmentent similairement phospho-P38. Par contre, le TTNPB, le rétinoïde le plus efficace à diminuer phospho-ERK1/2, n'a pas stimulé la phosphorylation de P38. L'inhibition pharmacologique d'ERK1/2 ou de P38 pendant le traitement des cellules avec l'AR a augmenté le rendement myogénique, et l'inhibition de P38 a, de plus, augmenté le rendement adipogénique. La voie des RXR est permissive à la fois à l'adipogenèse et à la myogenèse alors que celle des RAR n'est permissive qu'à l'adipogenèse. P38 serait un régulateur négatif de l'adipogenèse.

La différenciation à base d'OT produit des cardiomyocytes et, dans une moindre mesure, des cellules de muscle squelettique. L'OT est ajouté durant les quatre jours de l'agrégation et la période de maturation est de dix jours. Les rendements myogéniques sont faibles et nous avons pensé que l'ajout d'AR à l'OT pouvait les augmenter. Lorsqu'il est ajouté dès le J0 du traitement des cellules avec l'OT (addition précoce), l'AR inhibe la myogenèse. Cette inhibition est reliée aux RAR puisqu'elle est reproduite par le TTNPB et non le LG100268. Étonnamment, l'AR ajouté au J2 du traitement avec l'OT (addition tardive) fait plus que doubler le rendement des cellules musculaires, spécialement celui des cellules de muscle squelettique. L'AR a donc un effet dual, temporellement régulé, sur l'action myogénique de l'OT. Un tel effet est aussi observé sur la phosphorylation d'ERK1/2. OT stimule cette phosphorylation, et la stimulation est fortement inhibée par l'addition précoce mais non tardive d'AR. L'inhibition pharmacologique d'ERK1/2 abolit l'action myogénique d'OT. Par contre, l'ajout d'un activateur indirect d'ERK2 à la combinaison "OT + AR tardif" augmente la phosphorylation d'ERK1/2 ainsi que le rendement en cardiomyocytes. Des niveaux de phospho-ERK1/2 sont critiques pour la myogénèse et pour les rendements respectifs en cardiomyocytes et cellules de muscle squelettique.

En conclusion, les cellules P19 génèrent adipocytes, cardiomyocytes et cellules de muscle squelettique de façon concomitante lorsqu'elles sont induites avec l'AR. Dans ce processus, l'activation des RAR n'est permissive qu'à l'adipogenèse alors que celle des RXR permet l'adipogenèse et la myogenèse. L'action antimyogénique de l'activation des RAR est aussi observée en présence d'OT, cependant cette action ne se manifeste que si l'activation est faite tôt (J0). AR et OT influencent chacun la phosphorylation de MAPK et, réciproquement, leur action mésodermique est influencée par des modulateurs pharmacologiques de ces kinases. Le sens des influences peut cependant différer. Ainsi, les meilleurs rendements myogéniques ont été observés pour les traitements suivants : "AR + inhibiteur d'ERK (J2 à J5)", "AR + inhibiteur de P38 (J2 à J5)", "OT (J0 à J4) + AR (J2 à J4)", "OT + activateur d'ERK (J0 à J4) + AR (J2 à J4)". La modulation de l'activité des voies RAR, RXR et MAPK a une influence sur les rendements myogéniques et adipogéniques ainsi que sur les rendements en cardiomyocytes et en cellules de muscle squelettique. Le sens de l'influence dépend de la fenêtre temporelle de la modulation et de la présence ou non de l'OT.

Mots-clés : Cardiomyocytes, Cellules de muscle squelettique, Adipocytes, Acide rétinoïque, Ocytocine, Rétinoïdes, MAPK, ERK, P38, PCR, Immunobuvardage, Cytofluorescence, Cytochimie

INTRODUCTION

Le développement du cœur étant similaire dans les embryons des vertébrés, plusieurs analogies peuvent donc être faites et appliquées à l'humain. Ceci est d'une grande importance puisque les maladies congénitales du cœur sont fréquentes dans les pays industrialisés comptant 12 par 1000 naissances, et représentent environ 10% de toutes les malformations congénitales (Zile, 2004). À l'âge adulte, ce sont les maladies cardiovasculaires qui ont les taux de morbidité et mortalité les plus élevés dans le monde selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2011). Les personnes qui survivent à un infarctus du myocarde voient leur qualité de vie diminuer et la maladie progresse souvent vers un arrêt cardiaque (Siu, Moore et Li, 2007). Bien que plusieurs avancées dans le traitement des maladies cardiaques aient été faites, le pronostic de survie suite à un arrêt cardiaque est faible. Les principaux facteurs de risque associés à l'infarctus du myocarde sont l'âge, l'hypertension, le diabète, l'obésité, le cholestérol et le tabac (Canada, 2008 ; OMS, 2011).

Certaines études ont montré que des cellules souches adultes du cœur peuvent proliférer, se différencier en cardiomyocytes (CM) et contribuer à une augmentation de la masse musculaire du cœur après un infarctus du myocarde (Beltrami *et al.*, 2003 ; Matsuura *et al.*, 2004). Par contre, leur contribution à la régénération de la fonction cardiaque est limitée probablement dû à leur faible nombre. À l'heure actuelle, la transplantation d'un cœur entier demeure encore la seule thérapie efficace lors de problème cardiaque grave. Elle est par contre limitée par le faible nombre de donneurs et les possibilités de rejet par l'organisme receveur. Depuis quelques années, les thérapies cellulaires font leur apparition pour traiter les infarctus du myocarde afin de régénérer le myocarde endommagé. Ces thérapies consistent à implanter des cellules dans la zone infarctée. Plusieurs types cellulaires ont été utilisés incluant des myoblastes squelettiques, des cellules souches embryonnaires et adultes indifférenciées et des CM fœtaux avec des résultats parfois positifs, mais généralement peu concluants dans des modèles animaux (revue dans Tao et Li, 2007). Des études précliniques utilisant des cellules souches ont montré une augmentation de la fonction cardiaque, mais d'un recouvrement incomplet ou d'une durée limitée. Pour cette raison, des études *in vitro* (incluant cette thèse de doctorat) tentent de différencier des cellules souches en CM à des fins d'implantation. Il est espéré que ces néo-CM pourront s'intégrer structurellement et

fonctionnellement au myocarde et survivre à l'environnement hostile du cœur infarci (Christoforou et Gearhart, 2007 ; Dimmeler et Zeiher, 2009).

Jusqu'à présent, les rendements de différenciation en CM sont faibles. Les CM sont des dérivés du mésoderme, un feuillet embryonnaire qui donne aussi naissance à d'autres types cellulaires comme les adipocytes et les cellules musculaires de type squelettique. Les proportions des différents types cellulaires mésodermiques dans une culture ont été rarement analysées, mais nous avons pensé qu'un contrôle des conditions de différenciation pourrait permettre de favoriser l'apparition privilégiée d'un seul des phénotypes, le phénotype cardiomyocytaire, avec un meilleur rendement.

La présente thèse porte sur la différenciation mésodermique (CM, cellules de muscle squelettique (SKM) et adipocytes) de cellules de carcinome embryonnaire (EC) P19. Les cellules P19 offrent un modèle bien utilisé de cellules souches embryonnaires (ES) normales. Ces cellules EC ont été utilisées dans ce travail pour montrer l'implication de l'ocytocine (OT) et de l'acide rétinoïque (AR) dans la différenciation myogénique et adipogénique. L'utilisation d'analogues de l'AR ainsi que l'exploitation de la fenêtre temporelle d'induction apparaissent comme étant des outils supplémentaires afin de favoriser préférentiellement la formation de CM ou celle de SKM. Finalement, l'étude des protéine-kinases activées par des mitogènes (MAPK) a permis de montrer un rôle de ces kinases dans la balance des phénotypes musculaires cardiaque et squelettique.

La première partie de cette thèse porte sur l'état des connaissances actuelles sur les différents sujets reliés aux travaux expérimentaux, incluant le développement prénatal, les cellules souches, l'OT, l'AR et les MAPK. La deuxième partie présente l'hypothèse et les objectifs de travail et regroupe les résultats expérimentaux de l'auteur, rapportés sous la forme de trois articles. La troisième partie fait le bilan de l'ensemble des travaux et suggère de possibles avenues de recherche pour continuer les travaux.

PARTIE I
ÉTAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I : ASPECTS DU DÉVELOPPEMENT PRÉNATAL

1.1 Généralités

La période prénatale allant de la fécondation à l'accouchement dure environ 266 jours (38 semaines) chez l'humain. Ce développement se divise en trois périodes. La première période, s'échelonnant de la première à la deuxième semaine, est caractérisée par une multiplication cellulaire menant à l'implantation utérine. Cette période est suivie, des semaines deux à huit, par celle du développement précoce (ou embryonnaire) qui mènera à la formation des trois feuillets embryonnaires et à la mise en place de l'ensemble des organes composant le corps. La dernière phase, le développement fœtal, consiste en la différenciation terminale des organes et la croissance de l'être en devenir (Cochard et Netter, 2003).

1.2 Développement de l'embryon

Suivant la fécondation, l'ovule, qui est bloqué en métaphase de deuxième division de méiose, commence à se diviser ; c'est la segmentation qui commence. Cette étape sera suivie de la formation du blastocyste, de son implantation et de l'organogenèse (Franquinet et Foucrier, 2003).

1.2.1 La formation du blastocyste, la nidation et la gastrulation

La fécondation de l'ovule par le spermatozoïde s'effectue dans la trompe et permet l'achèvement de la deuxième division méiotique de l'ovule. Plusieurs divisions cellulaires mènent à la formation de la morula qui comporte 32 cellules compactées et est obtenue après le 5^e cycle de segmentation. Par la suite, une cavité se forme au centre de la morula pour mener au blastocyste. Le blastocyste est composé de deux populations cellulaires, le trophoctoderme qui est localisé sur tout le pourtour de la cavité et qui mènera à la formation du placenta, et le bouton embryonnaire, une masse cellulaire interne qui mènera à l'organogenèse. Cette masse cellulaire est située à un pôle de la cavité et ce pôle interagit avec la paroi utérine pour permettre l'implantation du futur embryon (Slack, 2006). Au site de l'implantation utérine, les cellules du trophoblaste libèrent des enzymes protéolytiques qui provoquent la lyse de l'épithélium utérin et permettent la nidation de l'embryon. La

gastrulation commence alors pour former les trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme), desquels dérivent tous les organes (Fig. 1.1). La formation du tube neural et de la crête neurale, précurseurs du système nerveux, se déroule durant la gastrulation, de même que l'ébauche cardiaque et celle de la portion antérieure de l'intestin (Franquinet et Foucrier, 2003).

1.2.2 L'organogenèse

De la troisième à la neuvième semaine il y a mise en place des organes composant l'être humain. L'ordre de formation de ces structures est décrit dans le tableau 1.1 et fait suite à la connexion de la vascularisation extra embryonnaire avec la vascularisation embryonnaire qui se déroule au 19^e jour de la grossesse. Suite à la période d'organogenèse, le fœtus se développe par une phase de croissance et de maturation fonctionnelle progressive des différents organes précédemment formés jusqu'à maturité.

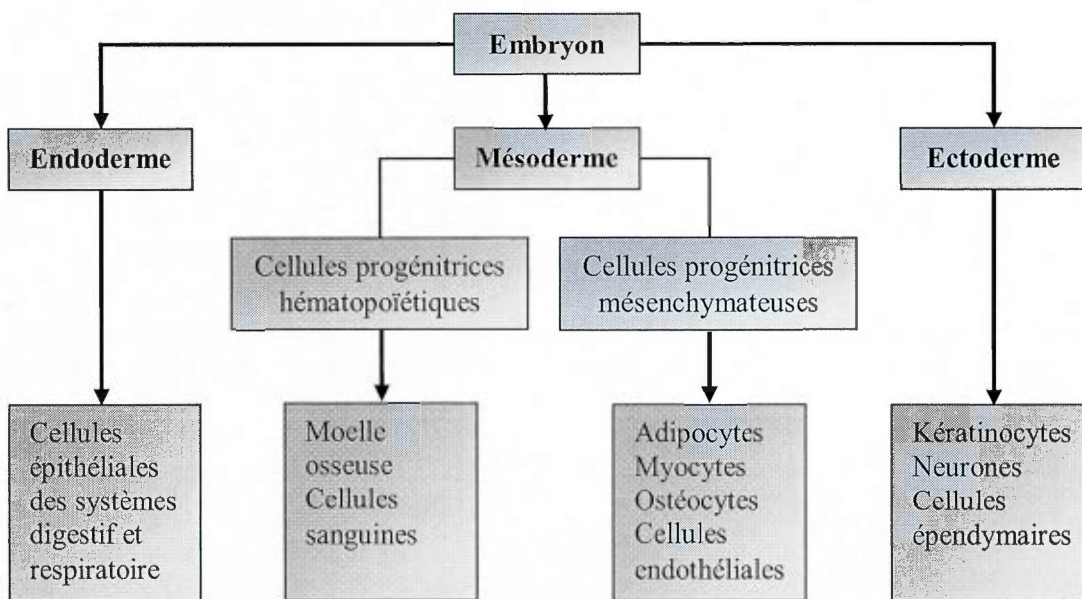


Figure 1.1 Les feuillets embryonnaires et leurs dérivées cellulaires. Lors de la gastrulation, il y a formation des trois couches germinatives : endoderme, mésoderme et ectoderme. Le feuillet endodermique forme les cellules épithéliales du système digestif et des voies respiratoires. Le mésoderme est à la base de la production des cellules progénitrices sanguines (hématopoïétiques) et des cellules progénitrices mésenchymateuses qui donnent naissance aux différentes cellules du parenchyme des organes. La couche ectodermique forme l'épiderme et l'ensemble du système nerveux.

1.3 Développement mésodermique

Le mésoderme se subdivise en cinq régions qui sont définies par un gradient de concentration de la protéine morphogénique de l'os (BMP), un facteur de croissance. Il est même possible de modifier les caractères d'une région mésodermique en y variant le niveau d'expression de BMP (Gilbert et Singer, 2004). Les cinq régions sont les suivantes :

- 1- Le chordomésoderme, lequel forme la notocorde, inducteur de la formation du tube neural et de l'établissement de la polarité antéro-postérieure.
- 2- Le mésoderme para-axial, lequel donne naissance aux somites, précurseurs des tissus conjonctifs du dos comme les os, les muscles et le derme.
- 3- Le mésoderme intermédiaire, lequel forme le système urogénital.
- 4- Le mésoderme des lames latérales, lequel forme le cœur et le système circulatoire, tapisse les cavités séreuses et participe à la formation des membres (excluant les muscles).
- 5- Le mésenchyme céphalique, lequel forme les tissus conjonctifs faciaux.

Le mésoderme est ainsi à l'origine de plusieurs organes et la formation de ces derniers se produit parallèlement à celle du tube neural (Slack, 2006).

Tableau 1.1 Chronologie de l'organogenèse (Adapté de Franquinet et Foucrier, 2003)

Temps	Événements
18 ^e -20 ^e jours	Ébauche du cœur
22 ^e -23 ^e jours	Modelage du cœur, bourgeonnement du foie et des poumons
24 ^e -25 ^e jours	Formation des reins, de la vésicule optique et des gonocytes
26 ^e jour	Circulation embryonnaire, différenciation du système digestif et bourgeonnement des membres supérieurs
28 ^e jour	Échange sanguin mère fœtus et bourgeonnement des membres inférieurs
32 ^e jour	Formation des cinq vésicules du cerveau
40 ^e -50 ^e jours	Modelage de la tête, de la cloison cardiaque, des mains et des pieds
Fin du 2 ^e mois	Formation du corps et des membres et ouverture des yeux

1.3.1 La somitogenèse

La somitogenèse est la segmentation de la structure mésodermique qui se produit d'une manière antéropostérieure de chaque côté du tube neural. À mesure que les replis neuronaux se rejoignent à la ligne médiane, le mésoderme se fragmente en blocs de cellules formant les somites. La formation des somites est gérée par l'antagonisme entre la BMP et la protéine Noggin, essentielle au développement embryonnaire et synthétisée au début de la formation du mésoderme. Les somites sont temporaires, mais fort utiles pour déterminer le degré d'avancement de l'embryogenèse. Ils donnent naissance aux vertèbres, aux côtes, au derme de la peau du dos et au muscle strié du tronc et des membres en fonction des gènes *Hox* et en réponse aux signaux des tissus environnants (Gilbert et Singer, 2004 ; Slack, 2006).

Le complexe *Hox* des vertébrés comprend 38 gènes séparés en quatre groupes : HoxA, B, C et D. Les gènes *Hox* sont responsables de la formation du système nerveux central, des structures crano-faciales et de la polarité antéropostérieure des membres chez les vertébrés (Marshall *et al.*, 1996). Positionnés de façon séquentielle sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), les gènes du complexe *Hox* sont exprimés dans la direction 3' → 5'. Les gènes des structures antérieures sont ainsi exprimés en premier. De plus, des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) sont retrouvés dans la séquence 3' des gènes *Hox* et une augmentation progressive de la concentration d'AR induit l'expression sélective des gènes *Hox* assurant par exemple le patron des doigts (Eichele, Tickle et Alberts, 1985 ; Marshall *et al.*, 1996).

1.3.2 La squelettomyogenèse

Certains somites constituent un myotome, duquel sont dérivées les cellules musculaires de type squelettique comme le montre la figure 1.2. Le myotome, qui est formé suite à l'induction par BMP-4, synthétise le facteur de transcription MyoD enclenchant la différenciation myogénique. Les myoblastes individuels initialement obtenus fusionnent ensuite (accolement et perte de la membrane plasmique de plusieurs myoblastes) pour former des myofibres multinucléées. Afin de permettre la croissance musculaire, les myofibres formant les muscles squelettiques ont, à leur surface, des cellules satellites pouvant se diviser

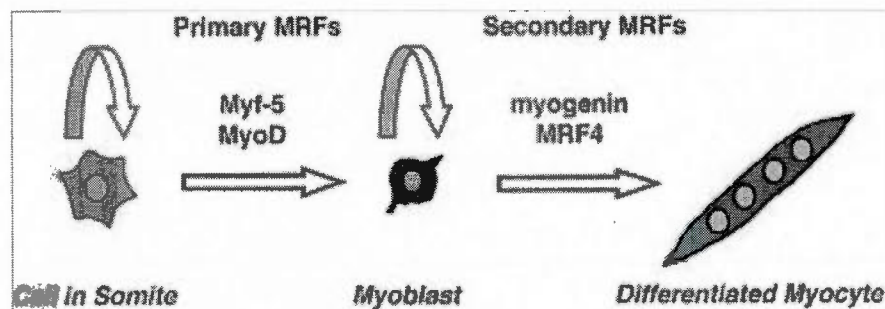


Figure 1.2 Obtention de myocytes différenciés à partir de certains somites. Les cellules de certains somites sont en constante prolifération et constituent le myotome. Lors de l'étape de détermination myogénique, l'activation de MyoD et de Myf-5 est essentielle à l'obtention d'un myoblaste. Sous l'effet de la myogénine et de MRF4, les myoblastes complètent leur différenciation pour former une myofibre multinucléée. (adapté de Sabourin et Rudnicki, 2000).

et exprimant le facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Gilbert et Singer, 2004 ; Slack, 2006).

MyoD fait parti de la superfamille de facteurs de transcription régulateurs de la myogenèse (MRF). En plus de MyoD (aussi appelé Myf-3), cette famille est composée de Myf-5, myogénine (Myf-1) et MRF4 (Myf-6) (Sabourin et Rudnicki, 2000). Les gènes encodant les quatre MRF sont exprimés selon une séquence temporelle précise et chaque membre est capable d'en activer un autre. Dans l'embryon de souris, le premier exprimé est Myf-5 des jours embryonnaires 8 à 14, suivi de la myogénine des jours embryonnaires 8,5 à 10,5. MyoD entre en jeu des jours embryonnaires 10,5 jusqu'à la différenciation terminale du myocyte et MRF4 est exprimé des jours 9 à 12 (Punch, Jones et Rudnicki, 2009 ; Sabourin et Rudnicki, 2000). Au stade adulte, les muscles squelettiques ont un réservoir de cellules indifférenciées capables de proliférer (cellules satellites) qui permettent la régénération du muscle lors d'activité physique intense ou de blessure (Le Grand et Rudnicki, 2007). Ces cellules expriment les facteurs de transcription Pax3 et Pax7 qui sont essentiels pour garder les cellules satellites dans un état latent, une surexpression de Pax3 inhibant la différenciation myogénique (Rudnicki *et al.*, 2008). Dans certaines maladies musculaires, il y a diminution de la prolifération des cellules satellites menant à une atrophie musculaire, comme c'est le cas dans la dystrophie musculaire de Duchesne. Des études de thérapie cellulaire sont

présentement en cours afin de favoriser la prolifération et la différenciation de cellules du muscle squelettique (Kuang et Rudnicki, 2008 ; Price, Kuroda et Rudnicki, 2007).

1.3.3 La formation du myocarde

Le cœur est le premier organe fonctionnel de l'embryon. Il provient de la fusion bilatérale de deux couches du mésoderme pour former la cavité corporelle (le coelome) s'étendant du cou à la région postérieure. Au cours du développement, le coelome se divise en trois cavités séparées : pleurale (le thorax), péricardique (le cœur) et péritonéale (l'abdomen). Les cellules du mésoderme sont sous le contrôle de la BMP et du FGF qui sont sécrétés par l'endoderme adjacent et induisent la synthèse du facteur de transcription Nkx2.5. Nkx2.5 active par la suite la synthèse de plusieurs facteurs de transcription de la famille GATA et MEF2 (Fig. 1.3) qui, à leur tour, activent la synthèse de protéines spécifiques du CM comme la troponine inhibitrice cardiaque (cTpnI), le facteur natriurétique auriculaire (ANF) et les chaînes lourdes et légères de la myosine cardiaque (MHC, MLC). Les CM se spécialisent en type ventriculaire et auriculaire, les ventriculaires apparaissant en premier. Par la suite, le tube se remodèle pour former les quatre chambres et les battements débutent. Ces battements sont obtenus grâce à une pompe sodium-calcium dans les membranes des cellules cardiaques suite à une stimulation électrique par le sinus veineux générant l'onde de contraction (Gilbert et Singer, 2004 ; Slack, 2006).

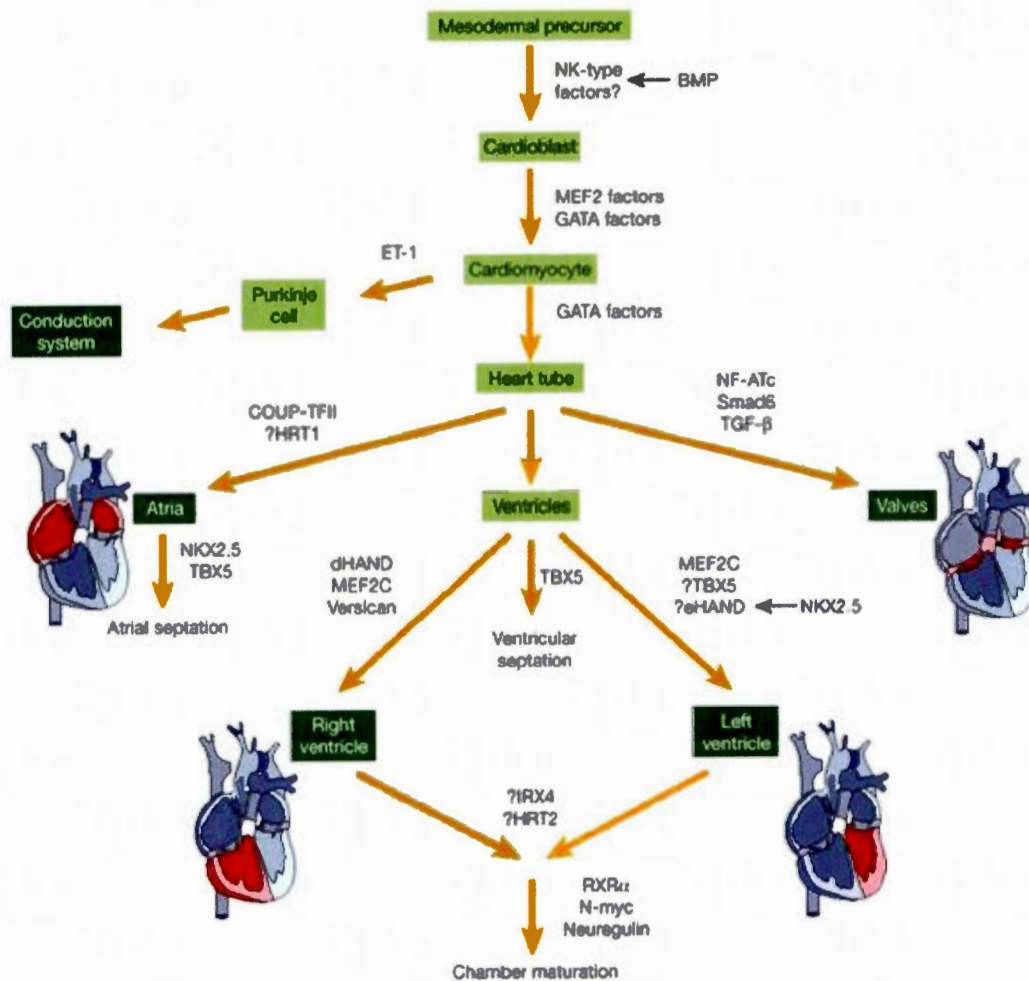


Figure 1.3 Principales étapes de la formation du cœur. Les cardioblastes provenant du mésoderme sont transformés en cardiomyocytes sous l'action des facteurs de transcription Nkx2.5 et GATA4. Les cardiomyocytes expriment alors des protéines musculaires cardiaques et forment le tube cardiaque qui deviendra le cœur suite à son cloisonnement en quatre compartiments (oreillette, valves, ventricule droit et gauche). Les facteurs nécessaires, ou possiblement nécessaires (?), à la formation de chacun des compartiments sont indiqués sous les flèches. (adapté de Gilbert et Singer, 2004 ; Srivastava et Olson, 2000).

Les BMP sont des protéines régulant une pléiotropie de fonctions cellulaires durant le développement embryonnaire et chez l'adulte (van Wijk, Moorman et van den Hoff, 2007). Les BMP font partie de la famille des facteurs de croissance transformants bêta (TGF- β) caractérisés par leur liaison à des récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase. Plus de 20 BMP ont été identifiées. Elles ont des profils d'expression temporels distincts et lient leurs récepteurs avec différentes affinités (Miyazono, Maeda et Imamura, 2005). BMP2 et 4 sont impliquées dans la différenciation cardiaque (Fig. 1.4). Elles doivent tout d'abord être inhibées de façon indirecte par FGF8 au stade de la prégastrulation pour permettre la formation du mésoderme cardiaque (Nakajima *et al.*, 2009). Puis lors de la gastrulation, le mésoderme cardiaque exprime BMP2 et 4, lesquelles seules n'induisent pas les facteurs de transcription cardiaques Nkx2.5 et GATA4. Ces BMP agissent de concert avec FGF8 pour permettre la maturation des CM (Nakajima *et al.*, 2009 ; van Wijk, Moorman et van den Hoff, 2007).

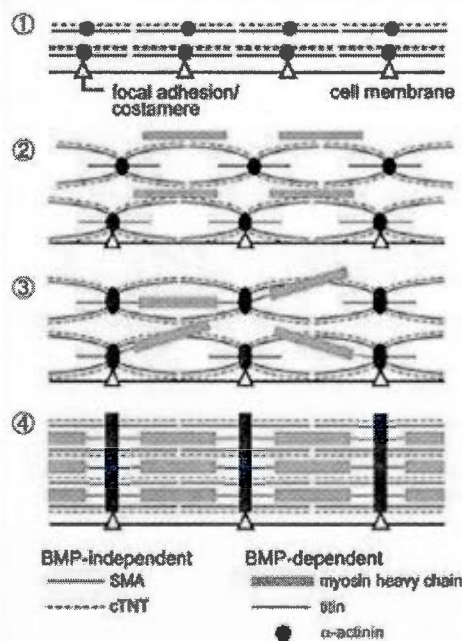


Figure 1.4 Importance de BMP dans la différenciation des cardiomyocytes. BMP dérivée de l'endoderme est impliquée dans la myogenèse du cœur. La présence de BMP est essentielle pour l'expression de l' α -actinine sarcomérique, la chaîne lourde de la myosine et la titine. Par contre, l'expression de l' α -actine du muscle lisse (SMA) et de la troponine T cardiaque (cTNT) sont indépendantes de BMP. (Nakajima *et al.*, 2009)

Les FGF sont une famille comportant 22 membres chez les vertébrés. Les FGF furent tout d'abord identifiés comme facteurs mitogéniques. Ils ont aussi des effets sur la survie, la migration et la différenciation cellulaires en culture. Lors de l'embryogenèse, les FGF jouent un rôle important dans l'induction du mésoderme et du neuroectoderme, du développement antéropostérieur et de la somitogenèse et du développement de différents organes comme le cœur (Dorey et Amaya, 2010). Comme le montre la figure 1.5, FGF4 et 8 sont essentiels à la formation du cœur à différents stades de différenciation (Nakajima et al., 2009).

1.3.4 La génération du tissu adipeux et les autres organes mésodermiques

Le mésoderme donne naissance à plusieurs autres structures comme les os, l'appareil urogénital et le tissu adipeux. Lors de l'ostéogenèse, il peut y avoir directement ossification du tissu mésenchymateux (ossification membranaire) ou formation de cartilage à partir des cellules mésenchymateuses suivie d'une seconde étape de remplacement du cartilage par le tissu osseux (ossification endochondrale). Le système urogénital comprend les reins, les gonades et la différenciation des sexes. Chez les mammifères, l'unité fonctionnelle du rein, le tubule rénal (néphron), est produit en trois étapes. Tout d'abord, un canal pronéphrotique prend forme et induit la formation d'un réseau de tubules, le pronéphros. Le pronéphros n'est

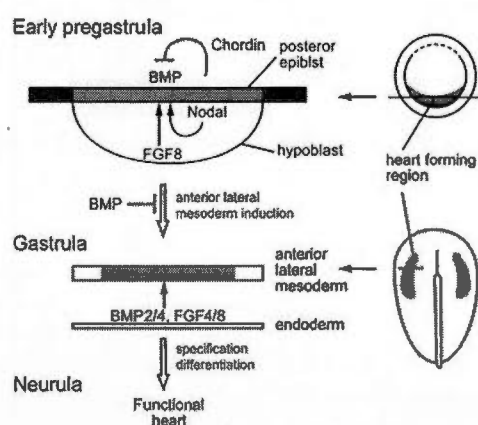


Figure 1.5 Importance de FGF dans la différenciation des cardiomyocytes La formation du mésoderme antérieur (précurseur du mésoderme cardiaque) est dépendante du facteur de croissance fibroblastique-8 (FGF8) et de Nodal. Ces deux facteurs doivent être exprimés ensemble pour permettre la synthèse de la chordine et ainsi inhiber l'activité de BMP à l'étape de la pré-gastrulation. À la gastrulation, FGF-8 agit de concert avec BMP2/4 pour permettre la différenciation terminale des cardiomyocytes (Nakajima *et al.*, 2009).

que transitoire et sera remplacé par un autre réseau de tubules, le mésonéphros. Le mésonéphros a plusieurs fonctions dans le développement : il est la source de cellules souches hématopoïétiques (donnant toutes les cellules sanguines), il est à l'origine du canal déférent et éjaculateur chez l'homme et il forme le rein permanent, le métanéphros (Gilbert et Singer, 2004). Les adipocytes apparaissent après 14 à 16 semaines de gestation dans les sites où il y a accumulation de gras chez l'adulte. L'initiation de l'adipogenèse, depuis l'adipoblaste au préadipocyte, est indépendante des hormones et met en jeu les récepteurs-gamma activés par des proliférateurs de peroxyosome (PPAR γ) et les translocases d'acides gras. Les hormones, comme par exemple l'hormone thyroïdienne T3 et l'insuline (Ins), et les catécholamines sont essentielles à la différenciation terminale des préadipocytes. La complétion de cette différenciation implique une induction de la protéine-alpha liant la séquence exhaustrice CCAAT (C/EBP α) et la machinerie enzymatique de synthèse et d'estérification des acides gras dont la lipoprotéine-lipase (LPL). À la naissance, les adipocytes comptent pour environ 16% du poids corporel. (Kiess *et al.*, 2008)

CHAPITRE II : LES CELLULES SOUCHES

2.1 Définition et types

La définition des cellules souches repose sur trois critères : les cellules souches doivent être multipotentes, capables de proliférer et capable d'auto-renouvellement par division symétrique ou asymétrique (Tuch, 2006). Il existe quatre types de cellules souches sur la base de leur potentiel à générer des types cellulaires différenciés : unipotentes, multipotentes, pluripotentes et totipotentes. Les cellules unipotentes ne peuvent former qu'une sorte de cellules différenciées. Les cellules multipotentes sont à l'origine d'au moins deux types de cellules différenciées, le plus souvent reliés à l'un ou l'autre des trois feuillets germinatifs ou à un organe. Par exemple, des cellules souches du système nerveux peuvent générer un neurone ou une cellule gliale. Dans la catégorie des cellules multipotentes, on retrouve les cellules souches de la moelle osseuse, dont les cellules hématopoïétiques (générant les différents types de cellules sanguines) et les cellules mésenchymateuses (donnant principalement les adipocytes, ostéocytes et chondrocytes). Les cellules totipotentes sont les cellules formant l'embryon dans les tout premiers jours de son développement ; elles génèrent tous les types cellulaires menant à la formation d'un organisme complet. Les cellules de l'embryon (ES) peuvent être cultivées *in vitro* et donner naissance à différents types cellulaires, mais comme on ne connaît pas les conditions menant à tous les types cellulaires, elles sont dites pluripotentes. D'autre part, la différenciation *in vivo* de ces cellules afin de former des cellules matures dépend de l'état de la cellule indifférenciée et de facteurs intrinsèques provenant de l'environnement immédiat appelé la niche (Perino *et al.*, 2008).

2.2 Cellules souches naturelles : embryonnaires et somatiques

Les cellules souches ES sont dérivées de la morula et s'organisent d'abord en deux couches, soient l'ectoderme, superficiellement, et l'endoderme, plus profondément. Entre ces deux couches, apparaît ensuite une troisième couche, le mésoderme. Ces trois couches ou feuillets vont constituer l'ébauche de tous les tissus et organes de l'organisme, comme nous l'avons vu à la section 1.2. Les cultures de cellules ES sont devenues un modèle de référence

pour comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant le choix de la cellule à se différencier en types cellulaires particuliers.

Des cellules souches sont aussi retrouvées dans plusieurs sinon la quasi-totalité des organes qui composent le corps humain que ce soit durant le développement avancé ou à l'âge adulte (Baksh, Song et Tuan, 2004). On les appelle cellules souches somatiques ou encore cellules souches adultes. Parmi les organes les plus utilisés comme source de cellules souches adultes, on compte la moelle osseuse, le muscle squelettique, le sang du cordon ombilical ainsi que les masses graisseuses, endroits d'où l'extraction des cellules est la plus facile (revu dans Si *et al.*, 2011). Les cellules souches adultes sont multipotentes, elles peuvent se différencier en phénotypes cellulaires spécifiques du tissu où elles nichent. Elles permettraient la réparation et/ou la régénération du tissu endommagé. Nous pouvons imaginer que si les cellules souches somatiques sont sorties de leur « niche » naturelle, leur spectre de différenciation pourrait être augmenté et que si elles sont mises en présence d'agent favorisant un type cellulaire particulier, elles pourraient se différencier en un type cellulaire totalement différent de ceux retrouvés dans le tissu d'origine (Baraniak et McDevitt, 2010). Les cellules souches somatiques ont un potentiel de différenciation plus restreint que les cellules ES. Cependant, elles sont considérées favorablement dans l'optique de transplantation cellulaire en médecine régénératrice (voir section 2.5). Elles permettent les autogreffes contournant ainsi les problèmes de rejet associés à des allogreffes. Elles permettent aussi d'éviter les problèmes éthiques reliés à l'utilisation de cellules ES (Teo et Vallier, 2010). Aussi de nombreux travaux se penchent présentement sur les conditions de différenciation de ces cellules *in vitro*.

2.3 Le modèle de cellules souches embryonnaires P19

Les cellules souches adultes ont possiblement déjà un caractère prédéterminé vers un nombre limité de phénotypes cellulaires matures. Par contre, les cellules ES, non prédéterminées sont un outil pertinent pour étudier à la fois détermination et maturation, les deux grandes étapes de la différenciation. Les cellules P19 utilisées dans le présent travail sont un modèle établi de cellules ES et permettent d'étudier la différenciation cellulaire *in vitro* (Andrews *et al.*, 2005). Les cellules P19 ont été obtenues à la suite de l'implantation de

cellules d'un embryon de 7,5 jours de souris dans un testicule de souris adulte (McBurney, 1993 ; McBurney *et al.*, 1982). Comme elles se sont retrouvées dans un milieu non utérin, les cellules implantées ont formé une tumeur appelée tératocarcinome. Cette tumeur contient des cellules différenciées de façon désordonnée ainsi que des cellules souches appelées cellules de carcinome embryonnaire (EC). La tumeur a été prélevée, dissociée et les cellules de EC isolées par sous-culture grâce à leur taux élevé de prolifération. Ainsi, les cellules P19 prolifèrent rapidement et sont pluripotentes puisqu'elles peuvent former des cellules dérivées des feuillets embryonnaires *in vitro*. *In vivo*, elles sont totipotentes. Ainsi, un blastocyste normal qui se développe dans l'utérus et dans lequel on a implanté des cellules P19 génère un fœtus normal, viable et dont tous les tissus contiennent les dérivés correctement différenciés des cellules P19 (Rudnicki et McBurney, 1987).

Les cellules P19 ont l'avantage d'être plus faciles à cultiver que les cellules ES naturelles. Ces dernières ont une tendance à se différencier spontanément *in vitro* et cela, de façon désordonnée. Pour réduire ou annuler cette tendance, ces cellules doivent être cultivées sur des cellules nourricières (fibroblastes embryonnaires) et en présence de facteurs inhibiteurs de la différenciation tel que le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF). Au contraire, les cellules P19 se différencient peu de façon spontanée. Elles conservent leur caractère non différencié en l'absence de cellules nourricières et de LIF. La sécrétion d'inhibiteurs de la différenciation par les cellules P19 serait un des mécanismes de leur résistance à la différenciation spontanée (Kawazoe *et al.*, 2009). Une différenciation contrôlée des cellules ES *in vitro* passe le plus souvent par la production de corps embryoïdes, des agrégats sphériques multicellulaires proposant en partie un environnement similaire à celui de l'embryon. Par la suite, les corps embryoïdes sont cultivés en couches adhérentes à un support de culture pour y observer les cellules différenciées. Des agents inducteurs sont utilisés durant la phase de formation des corps embryoïdes et/ou durant la phase d'adhésion (McBurney, 1993).

L'induction des agrégats de cellules P19 avec l'AR (10^{-6} M) permet de différencier les cellules en neurones et astrocytes (Rudnicki et McBurney, 1987). Les cellules P19 peuvent aussi être différenciées en cellules musculaires de type cardiaque et squelettique par une

induction avec l'AR à de plus faibles concentrations (10^{-8} - 10^{-9} M), le DMSO (0,5 -1,0 v/v %) ou 10^{-7} M d'OT (Danalache *et al.*, 2007 ; McBurney *et al.*, 1982 ; Paquin *et al.*, 2002 ; Rudnicki et McBurney, 1987). Il est aujourd'hui possible d'induire la différenciation de cellules EC humaines, mais leur différenciation *in vitro* prend plus de temps que les cellules EC de souris.

2.4 Les cellules souches induites (IPS)

Dans le développement de thérapies pour l'implantation cellulaire, un troisième type de cellules souches a été récemment mis au point. Il s'agit des cellules souches pluripotentes induites (IPS). Les cellules souches adultes sont développementalement plus restreintes que les cellules ES mais ces dernières ont le potentiel de former des tératomes dans l'organisme hôte. Aussi, des travaux ont été faits dans le but de conférer un caractère pluripotent à des cellules adultes. Des fibroblastes de souris et d'humain ont été ainsi modifiés pour ressembler aux cellules souches embryonnaires, ce sont des cellules IPS (Takahashi *et al.*, 2007 ; Takahashi et Yamanaka, 2006). Les cellules IPS ont été obtenues suite à une infection par des rétrovirus des gènes codant pour Oct3/4, Sox-2, c-Myc et Klf4 ; tous des facteurs de transcription reliés à la pluripotence (Takahashi *et al.*, 2007 ; Takahashi et Yamanaka, 2006). La présence du facteur c-Myc ne permet malheureusement pas de contrer le risque de formation d'un tératome suite à une greffe cellulaire, mais récemment une équipe de recherche a montré que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'antigène-5 spécifique du stade embryonnaire (SSEA-5) permet d'inhiber la formation de tératome à partir de cellules IPS humaines (Tang *et al.*, 2011). Depuis, il est possible d'obtenir des cellules IPS sans utilisation de rétrovirus qui s'intègre dans le génome hôte. L'utilisation d'adénovirus permet l'expression des mêmes quatre facteurs dans la cellule, mais de façon transitoire (Stadtfield *et al.*, 2008). L'utilisation de plasmides permet aussi d'obtenir des résultats similaires (Okita *et al.*, 2008).

2.5 Les types de cellules souches et la médecine régénératrice

Cette récente possibilité de reprogrammer des cellules somatiques en cellules pluripotentes augmente l'intérêt clinique envers les cellules souches. Le but de la médecine régénératrice est d'implanter des cellules fonctionnelles dans différents organes malades pour

recupérer la fonction physiologique et/ou stimuler la différenciation des cellules souches résidentes. Depuis plus de 40 ans, des cellules souches hématopoïétiques sont transplantées dans la moelle osseuse de patients souffrant de diverses maladies sanguines comme la leucémie (Burt *et al.*, 2008). L'utilisation de cellules souches en médecine régénératrice ouvre la porte au traitement de plusieurs maladies dégénératives comme le diabète de type 1, les dégénérescences neuronales (la sclérose multiple, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington) et les maladies du cœur (un infarctus du myocarde ou une myopathie) (Teo et Vallier, 2010). Le tableau 2.1 présente une liste non exhaustive de types cellulaires pouvant être obtenus à partir des cellules souches humaines. Des cellules souches somatiques peuvent être localisées dans une niche spécifique, essentielle pour maintenir leur renouvellement et différenciation, ce sont des cellules souches somatiques résidentes (Yin et Li, 2006). Par exemple, le cerveau, la peau, le cœur, les muscles, les poumons, les intestins et le foie sont des organes possédant des cellules souches somatiques endogènes ou résidentes. On les appelle aussi des cellules « progénitrices » sous-entendant une tendance déjà acquise à se différencier dans une voie particulière (revue dans Teo et Vallier, 2010).

Tableau 2.1 Types cellulaires formés in vitro à partir de cellules souches humaines.

Cellules souches	Cellules différenciées	Références
Embryonnaires	Cellules rétinales	(Klimanskaya <i>et al.</i> , 2004 ; Lund <i>et al.</i> , 2006)
	Neurones moteurs	(Li <i>et al.</i> , 2005)
	Cardiomyocytes	(Caspi <i>et al.</i> , 2007 ; Dai <i>et al.</i> , 2007)
	Cellules β pancréatiques	(Kroon <i>et al.</i> , 2008 ; Zhang <i>et al.</i> , 2009)
	Hépatocytes	(Cai <i>et al.</i> , 2007)
Mésenchymateuses	Adipocytes	(in 't Anker <i>et al.</i> , 2003)
	Ostéoblastes / Ostéocytes	(in 't Anker <i>et al.</i> , 2003)
	Chondrocytes	(Indrawattana <i>et al.</i> , 2004)
	Cellules épithéliales	(Sueblinvong <i>et al.</i> , 2008)
	Neurones	(Greco et Rameshwar, 2007)
	Myocytes (<i>in vivo</i>)	(de la Garza-Rodea <i>et al.</i> , 2011)
Induites	Neurones moteurs	(Dimos <i>et al.</i> , 2008)
	Cellules β pancréatiques	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
	Hépatocytes	(Si-Tayeb <i>et al.</i> , 2010)
	Cellules hématopoïétiques	(Ye <i>et al.</i> , 2009)
	Cellules de la rétine	(Carr <i>et al.</i> , 2009)
	Cardiomyocytes	(Ren <i>et al.</i> , 2011 ; Zwi <i>et al.</i> , 2009)

2.5.1 La régénération cardiaque par les cellules souches

L'utilisation des cellules souches pour la régénération du cœur est un des axes de recherche les plus actifs. Plusieurs types cellulaires ont été proposés pour réparer le cœur endommagé : des myoblastes squelettiques, des fibroblastes, des cellules du muscle lisse, des myocytes fœtaux, des cellules ES, des cellules souches mésenchymateuses (MSC) ou hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse, des cellules IPS et des cellules cardiaques progénitrices (CPC) (revue dans Hosoda *et al.*, 2011). Les myocytes fœtaux, les fibroblastes et les cellules du muscle mou forment un greffon passif ayant un effet positif sur la fonction cardiaque en diminuant la raideur ventriculaire. Les cellules ES se greffent au myocarde mais meurent rapidement par manque de vascularisation et par rejet par le système immunitaire (Laflamme et Murry, 2005). L'utilisation des myoblastes squelettiques remonte aux années 1930. Cette technique demande l'implantation, sur la partie du cœur infarcté, de larges feuillets de muscle squelettique cultivés et amplifiés pour former des myotubes *in vitro*. Les études ont malheureusement montré un manque d'intégration des myotubes dans le myocarde ainsi qu'une absence de synchronisation des battements et de l'arythmie (Hosoda *et al.*, 2011). Pour ces raisons, les myoblastes squelettiques ne sont plus utilisés pour la régénération cardiaque. Des CPC ont été découvertes dans le cœur de souris, elles sont positives pour les marqueurs de surface c-KIT ou SCA-1 et ont la propriété d'évacuer les marqueurs fluorescents ou de former des sphéroïdes multicellulaires (Anversa et Nadal-Ginard, 2002). Ces cellules provenant de la portion apicale du ventricule ou d'une partie éloignée de la paroi du cœur nécessitent d'être amplifiées *in vitro* avant de pouvoir être réimplantées. Les résultats quant à l'intégration, la différenciation et l'amélioration de la fonction du cœur sont mitigés, mais des études cliniques sont en cours pour les clarifier (revue dans Hosoda *et al.*, 2011 ; Laflamme et Murry, 2011). L'utilisation des cellules souches demeure très prometteuse. Des études cliniques utilisant des cellules de la moelle osseuse ont montré des effets bénéfiques à long terme sur le cœur infarcté (Chen *et al.*, 2004 ; Hare *et al.*, 2009). Par contre, ces cellules ne se différencient pas en CM *in vitro* et *in vivo* et nécessitent une amplification *in vitro* afin d'implanter un type particulier. Les cellules ES peuvent être différenciées *in vitro* en CM avec un rendement dépassant rarement 20%. L'utilisation d'hormones, de facteurs de croissance et de petites molécules pourrait améliorer ce

rendement et permettre éventuellement l'implantation de CM dérivés des cellules ES ou encore de cellules IPS anti-rejet (Chen, Wu et Wang, 2008).

Les MSC de la moelle osseuse sont obtenues par centrifugation sur gradients de densité et comptent pour environ 0,1% des cellules extraites (Dimmeler et Zeiher, 2009). Les MSC isolées sont livrées de façon intra-coronarienne dans l'artère du ventricule gauche ayant subi des dommages dûs à l'ischémie-reperfusion (Laflamme et Murry, 2011). Les effets bénéfiques seraient principalement dûs à des facteurs paracrines qui auraient pour effet de diminuer l'apoptose cellulaire et d'augmenter la vascularisation. Souvent, il en résulte une augmentation de la fraction d'éjection ventriculaire de l'ordre de 6 à 15% (Si *et al.*, 2011). Cette amélioration de la fonction cardiaque a été observée jusqu'à 18 mois suivant l'injection de cellules souches et les meilleurs rendements sont obtenus chez les patients ayant perdu plus de la moitié de la fraction d'éjection normale (Dimmeler et Zeiher, 2009).

2.6 Facteurs et mécanismes de différenciation *in vitro* des cellules souches

Il y a une abondante littérature en ce qui a trait à l'identification des conditions capables d'induire la différenciation des cellules souches *in vitro*. Les mécanismes cellulaires et génétiques permettant la différenciation *in vivo* sont encore incomplètement compris. Des études sont encore nécessaires pour mieux comprendre ces mécanismes afin de les reproduire ou de les stimuler. Le transfert génétique et l'utilisation d'acide ribonucléique (ARN) interférent sont très utilisés pour comprendre ces mécanismes mais ils ne sont pas nécessairement désirables pour induire la différenciation de cellules devant être implantées. Le tableau 2.2 présente deux grandes catégories de molécules extracellulaires induisant la différenciation mésodermique des cellules souches. Tout d'abord, les molécules de haut poids moléculaire comme les facteurs de croissance protéiques et les cytokines ou certaines hormones peptidiques. Ce sont des molécules instables dans un milieu biologique et difficiles à produire et à modifier de façon fonctionnelle. D'autre part, les molécules de faible poids moléculaire comme les vitamines et les inducteurs chimiques sont de plus en plus utilisées. Dans cette catégorie, les molécules utilisées sont généralement de structure plus simple et plus stable biologiquement. Il est aussi possible de modifier ou mimer ces substances de faible poids moléculaire afin de cibler spécifiquement certains récepteurs ou voies de

signalisation. Par exemple, des analogues de l'AR. Il est aussi possible de combiner des molécules comme c'est le cas dans la différenciation adipogénique des cellules ES. Cette différenciation nécessite l'utilisation de l'AR, une petite molécule de type vitamine, en plus de l'ajout de T3, une hormone stéroïdienne et de l'Ins, un facteur protéique de croissance (Dani *et al.*, 1997). En dernier lieu, des molécules chimiques non physiologiques (ex. le DMSO) peuvent aussi induire la différenciation cellulaire mais elles sont peu utilisées pour la médecine régénératrice.

Les chapitres III et IV de ce document sont consacrés à l'OT et l'AR puisque nous utilisons ces molécules comme agents inducteurs de différenciation des cellules P19 dans la thèse. De plus, le chapitre V porte sur les MAPK parce que quelques études rapportent un rôle de ces kinases dans la différenciation et que nous croyons qu'il existe une relation entre des MAPK et l'action morphogénique de l'OT et de l'AR.

Tableau 2.2 Exemples d'inducteurs utilisés pour la différenciation de cellules souches.

Inducteurs	Cellules traitées	Cellules dérivées	Références
Facteurs de croissance/cytokines			
BMP2	ES	CM	(Behfar <i>et al.</i> , 2002 ; Kawai <i>et al.</i> , 2004)
Cardiotrophine-1	ES	CM	(Sauer <i>et al.</i> , 2004)
FGF2	ES	CM	(Kawai <i>et al.</i> , 2004)
IGF-II	ES	CM	(Morali <i>et al.</i> , 2000)
		SKM	
TGF- β	ES	CM	(Behfar <i>et al.</i> , 2002)
Wnt11	ES	CM	(Terami <i>et al.</i> , 2004)
Hormones peptidiques			
Dynorphine B	ES	CM	(Ventura <i>et al.</i> , 2003)
Ocytocine	ES	CM	(Hatami, Valojerdi et Mowla, 2007)
	EC	CM	(Danalache <i>et al.</i> , 2007 ; Paquin <i>et al.</i> , 2002)
	MSC	SKM	(Ybarra, del Castillo et Troncy, 2011)
		CM	(Tropel <i>et al.</i> , 2004)
Insuline	MSC	Adipocytes	
Hormones stéroïdiennes et vitamines			
AR (dérivé de vit. A)	ES	Adipocytes, Muscle	(Dani <i>et al.</i> , 1997)
	ES	SKM	(Kennedy <i>et al.</i> , 2009 ; Ryan <i>et al.</i> , 2011)
	EC	CM	(Rudnicki et McBurney, 1987)
		SKM	
Acide ascorbique (vit. C)	ES	CM	(Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
T3	EC	CM	(Rodriguez <i>et al.</i> , 1994)
Autres molécules physiologiques			
NO	ES	CM	(Kanno <i>et al.</i> , 2004)
	EC	CM	(Danalache <i>et al.</i> , 2007)
		SKM	
Molécules non physiologiques			
5-Azacytidine	EC	CM	(Choi <i>et al.</i> , 2004)
		SKM	
	MSC	CM	(Makino <i>et al.</i> , 1999)
		SKM	
DMSO	EC	CM	(Rudnicki <i>et al.</i> , 1990 ; Skerjanc, 1999)
		SKM	
Lithium	EC	CM	(Schmidt, Guan et Wobus, 2001)
		SKM	

AR : Acide rétinoïque, BMP : *Bone Morphogenic protein*, CM: cardiomyocytes, DMSO: Diméthylsulfoxyde, FGF : *Fibroblast growth factor*, IGF : *Insulin growth factor*, Ins: Insuline, MSC: Mesenchymal stem cell, NO: Nitric oxide, SKM: cellules de muscle squelettique, T3: Triiodothyronine, TGF: *Transforming growth factor*, Wnt: *wingless-type MMTV integration site family*.

CHAPITRE III : L'OCYTOCINE (OT) COMME AGENT DE DIFFÉRENCIATION

3.1 Structure et biosynthèse de l'OT

C'est en 1928 que Kamm a réussi à cristalliser et à séparer deux substances de l'hypophyse : l'alpha-hypophamine ocytocique (nommée aujourd'hui ocytocine ou OT) et la bêta-hypophamine vasopressive (nommée aujourd'hui vasopressine ou VP). En 1953, les structures de l'OT et de la VP ont été élucidées par Du Vigneaud et se sont révélées similaires (Fig. 3.1). Deux ans plus tard, ce chercheur a reçu le prix Nobel pour la détermination de la séquence en acides aminés de l'OT ainsi que pour sa synthèse en laboratoire. Les étapes de biosynthèse de l'OT ont été élucidées par après. L'OT est synthétisée sous la forme d'un précurseur (pré-pro-OT) constitué d'un peptide signal (séquence « pré ») ainsi que des séquences de l'OT et de la neurophysine-I (NP-I) séparées par trois acides aminés (Gly-Lys-Arg). Le clivage du peptide signal forme la pro-OT (Fig. 3.2), laquelle est ensuite convertie en OT mature par l'action successive d'une prohormone-convertase, d'une carboxypeptidase de type B (carboxypeptidase E) et d'une enzyme d'amidation, la peptidylglycine- α -amidating-monooxygénase (Altstein et Gainer, 1988).

En plus de l'axe hypothalamo-hypophysaire, des sites de synthèse de l'hormone furent découverts dans plusieurs tissus incluant les systèmes reproductifs femelle (utérus, placenta

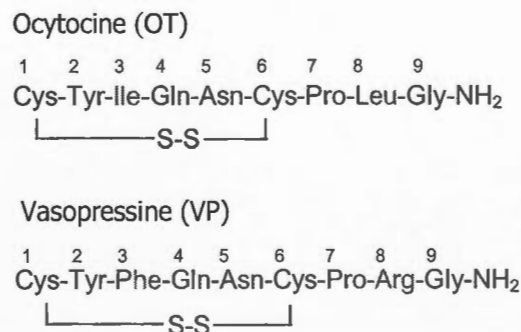


Figure 3.1 Structure primaire de l'ocytocine et la vasopressine. L'ocytocine et la vasopressine ont une séquence en acides aminés similaire ne différant qu'au niveau des acides aminés en positions 3 et 8 (Du Vigneaud, Ressler et Trippett, 1953).

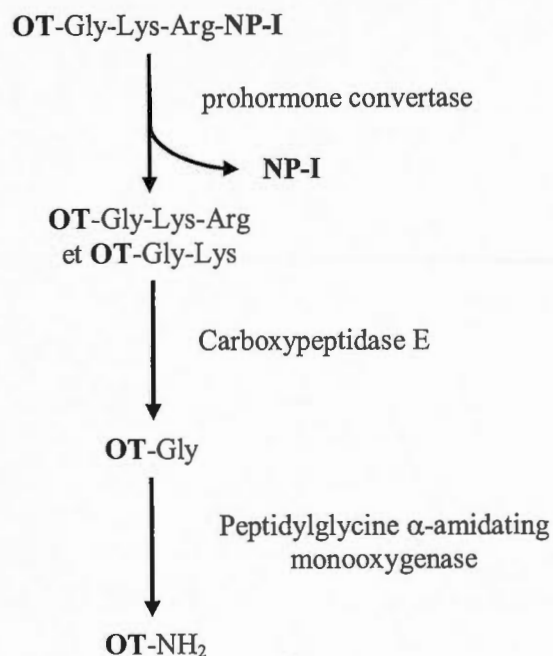


Figure 3.2 Biosynthèse de OT à partir de sa forme pro-OT. La portion neurophysine-I (NP-I) est enlevée de la prohormone OT-Gly-Lys-Arg-NP-I par l'action d'une endopeptidase de type convertase qui clive après des acides aminés basiques. Ensuite, une carboxypeptidase de type B (la carboxypeptidase E) clive les résidus Arg et Lys surnuméraires pour former l'intermédiaire OT-Gly. Ce dernier subit une amidation par l'enzyme d'amidation (la peptidylglycine-α-amidating-monooxygenase) menant à la forme active de OT (Altstein et Gainer, 1988).

et ovaire) et mâle (testicule, épидидyme et prostate), ainsi que les glandes surrénales, la glande pinéale, le thymus et le cerveau des deux sexes (Ang et Jenkins, 1984 ; Argiolas *et al.*, 1990 ; Dogterom, Van Wimersma Greidanus et Swabb, 1977 ; Gauquelin *et al.*, 1988 ; Gimpl et Fahrenholz, 2001). Plus récemment, il y a eu la découverte de la synthèse de l'OT et de son récepteur (OTR) dans le cœur et le système vasculaire de la souris (Gutkowska *et al.*, 1997 ; Jankowski *et al.*, 2004). L'OT a une demi-vie de 3 à 5 min chez l'humain et est métabolisée au niveau du foie, du rein, des glandes mammaires et de l'utérus chez la femme enceinte. La dégradation de l'OT est réalisée par une enzyme plasmatique, l'ocytocinase, enzyme aussi présente dans le placenta où elle porte également le nom de Leu-aminopeptidase placentaire (Fabian *et al.*, 1969).

3.2 Différents rôles et mécanismes d'action

L'OT hypophysaire est sécrétée dans la circulation systémique et elle agit comme hormone endocrine sur des cellules à distance du lieu de libération incluant les cellules de l'utérus dont elle provoque les contractions des cellules du muscle lisse menant à l'accouchement (den Hertog, de Groot et van Dongen, 2001) et les cellules des glandes mammaires pour faciliter l'éjection du lait (Nishimori et Matzuk, 1996 ; Wagner *et al.*, 1997 ; Young *et al.*, 1998). Outre ses actions bien connues dans l'accouchement et l'allaitement, l'OT a aussi des effets antidiurétiques (rapportés par Von den Velven dès 1913) ainsi que des rôles dans la prise d'eau et de nourriture, la mémoire sociale et les liens affectifs (entre parents et rejetons, entre partenaires dans la reproduction) (Insel, 1997 ; Winslow et Insel, 2002). Des niveaux réduits d'OT et de son récepteur sont associés à des désordres mentaux comme l'autisme (Hammock et Young, 2006 ; Hollander *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2005).

C'est au début des années 1980 que le mécanisme utérotonique traduisant le signal hormonal a été élucidé (Fuchs *et al.*, 1984). Lorsque l'OT lie son récepteur, elle induit une augmentation du taux d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) intracellulaire, ce qui entraîne une libération vers le cytoplasme des ions Ca^{2+} contenus dans le réticulum endoplasmique (RE). Voici les différentes étapes menant à la libération du calcium. Tout d'abord, l'OT fixe son récepteur couplé à une protéine G, ce qui stimule l'activité de la phospholipase C (PLC) et la production d'IP3. La PLC hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2), générant le 1,2-diacylglycérol (DAG) qui reste ancré à la membrane et l'IP3 hydrosoluble qui se lie à des canaux calciques du RE. La libération subséquente de Ca^{2+} vers le cytosol induit une contraction. Suite à la contraction, l'IP3 est hydrolysé en inositol-1,4-biphosphate (IP2) afin de ne plus affecter l'efflux du calcium.

3.3 Rôles de l'OT dans le cœur et la différenciation cardiaque

En 1997, l'équipe du Dr Gutkowska a démontré pour la première fois l'existence d'un système complet de l'OT avec OTR dans le cœur et le système cardio-vasculaire chez le rat (Gutkowska *et al.*, 1997 ; Jankowski *et al.*, 1998). Cette équipe a montré qu'OT/OTR joue un rôle de régulateur de la pression sanguine via la libération d'ANF, un puissant vasodilatateur. De plus, l'OT augmente la force de contraction du cœur en exerçant une action inotropique et

chronotrope négative sur le cœur isolé et perfusé (Favaretto *et al.*, 1997 ; Mukaddam-Daher *et al.*, 2001). En accord avec les études sur le cœur isolé d'animaux normaux, de l'hypotension et une augmentation du gain baroréflexe à la pression sanguine ont été observées chez des souris OT^{-/-} (Michelini *et al.*, 2003).

3.3.1 Les raisons de l'intérêt pour l'OT comme agent cardiomyogénique

En 1985, il fut démontré que le niveau d'OT dans la circulation systémique augmente chez les femmes enceintes et qu'une partie de cette augmentation serait d'origine fœtale (de Geest *et al.*, 1985). De plus, chez le rat un niveau élevé d'OT est observé dans le cœur au 21^e jour de gestation ainsi qu'au jour 1 à 4 post-natal, période où les myocytes cardiaques sont à un niveau élevé d'hyperplasie (Paquin *et al.*, 2002). Lorsque des niveaux d'OT sont administrés en excès, des problèmes de croissance cardiaque comme l'hypertrophie ont été observés chez le rat et l'humain (Chard *et al.*, 1970 ; Schriefer, Lewis et Miller, 1982). À l'inverse, l'utilisation d'un antagoniste (OTA) pour inhiber OTR dans la phase précoce de développement de l'œuf de poulet mène à des malformations cardiaques chez l'embryon (Paquin *et al.*, 2002). Jumelée à la découverte du système OT/OTR dans le cœur (Jankowski *et al.*, 1998), cette collection d'observations a mené l'équipe du Dr Paquin en collaboration avec celle du Dr Gutkowska à étudier et évaluer le potentiel cardiomyogénique de l'OT sur la lignée P19 de cellules souches (Paquin *et al.*, 2002).

3.3.2 Démonstration de l'action cardiomyogénique de l'OT

C'est en 2002 qu'a été démontrée la capacité de l'OT à induire la différenciation de cellules souches en CM (Paquin *et al.*, 2002). Le mécanisme implique OTR puisque l'utilisation de OTA inhibe la différenciation cardiomyogénique induite par OT. Un effet OT/OTR serait aussi impliqué dans l'action cardiomyogénique du DMSO puisqu'elle est aussi bloquée par OTA. La forme biosynthétique intermédiaire, OT-Gly-Lys-Arg, menant à l'OT mature (Fig. 3.2) est aussi cardiomyogénique dans les cellules P19 en plus d'être la forme prépondérante d'OT dans le cœur du rat nouveau-né (Danalache *et al.*, 2010). Il semblerait que l'action cardiomyogénique de l'OT passe par une augmentation de la libération de Ca²⁺, signalisation déjà suspectée lors de l'utilisation du DMSO (van der

Heyden et Defize, 2003). De plus, le mécanisme implique aussi l'oxyde nitrique (NO)-synthase (NOS) puisque l'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme (le *N*,*G*-nitro-*L*-arginine-méthyl-ester ou L-NAME) inhibe l'effet cardiomyogénique de l'OT dans les cellules P19 (Danalache *et al.*, 2007). NO est essentiel à la différenciation optimale de CM à partir de cellules ES (Kanno *et al.*, 2004) et la différenciation à base d'OT passe par la génération de NO puisque l'utilisation d'un générateur de NO (le *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine ou SNAP) permet l'observation de cellules battantes à partir de cellules P19 (Danalache *et al.*, 2007).

L'action cardiomyogénique de l'OT n'est pas spécifique aux cellules P19. Ainsi, le traitement avec OT de cellules ES de souris, qui expriment OTR à leur stade indifférencié, accélère l'apparition des cellules battantes (Hatami, Valojerdi et Mowla, 2007). L'OT exerce aussi une action cardiomyogénique sur les cellules souches somatiques du cœur chez la souris (Matsuura *et al.*, 2004). Dans cette étude, des cellules Sca-1⁺ présentant des propriétés de cellules souches expriment, suite à l'induction avec l'OT, les gènes des facteurs de transcription cardiaques ainsi que de protéines contractiles en plus de montrer une augmentation des niveaux de Ca²⁺ (Hatami, Valojerdi et Mowla, 2007). L'OT est aussi cardiomyogénique sur les MSC de porc tel que démontré par l'augmentation des transcrits et des protéines impliqués dans la contraction des CM, via la voie des NOS (Ybarra, del Castillo et Troncy, 2011). L'implication de NO a été démontrée dans cette dernière étude. De plus, l'OT et son récepteur sont présent dans cœur de souris et humain (Jankowski *et al.*, 2004 ; Jankowski *et al.*, 1998).

CHAPITRE IV : L'ACIDE RETINOÏQUE (AR) COMME AGENT DE DIFFÉRENCIATION

4.1 Importance et source de l'AR et autres rétinoïdes

La vitamine A (rétinol) est essentielle au développement embryonnaire et au fonctionnement de l'organisme adulte autant chez l'homme que chez la femme (Fig. 4.1). L'acide *tout-trans* rétinoïque (atRA) est la molécule la plus active de la vitamine A (Ross *et al.*, 2000).

Les rétinoïdes sont des molécules lipophiles de structure apparentée au rétinol que l'on retrouve exclusivement dans l'alimentation. Les rétinoïdes sont instables et s'isomérisent rapidement, notamment sous l'effet de la lumière. Les isomères de l'AR les plus retrouvés chez les mammifères sont le *tout-trans*, le 9-cis et le 13-cis. Les rétinoïdes sont aussi

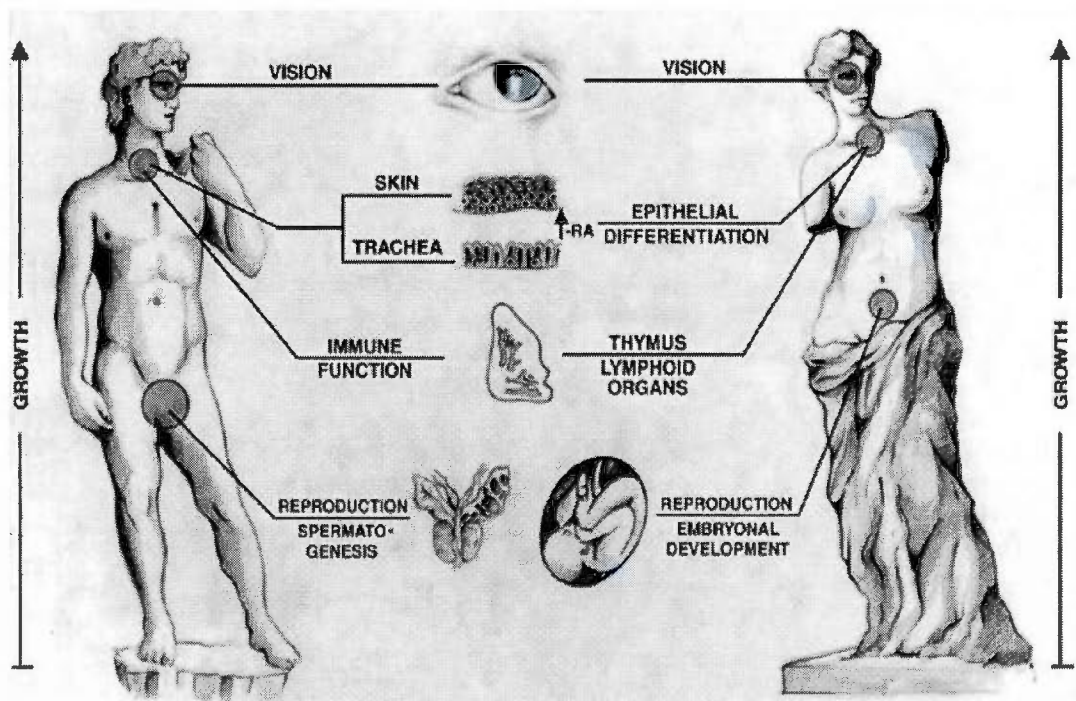


Figure 4.1 Résumé des fonctions variées de la vitamine A au stade adulte (Ross *et al.*, 2000).

sensibles à l'oxygène, l'oxydation provoquant leur inactivation (Barua et Furr, 1998). De ces isomères, c'est l'atRA qui est le plus abondant. Dans le reste du texte, les abréviations atRA et AR sont équivalentes. L'AR est obtenu à partir du rétinol suite à des transformations enzymatiques. Il existe aussi des formes biologiquement inactives de rétinol comme les esters de rétinol (dans le foie des animaux) et la β -carotène (dans les végétaux) qui servent au stockage du rétinol. Le rétinal, un intermédiaire de la synthèse de l'AR, seraient aussi bioinactif. Les métabolites polaires seraient moins inactifs que pensés initialement et sont obtenus à la suite de la métabolisation de l'atRA et de ses isoformes. Les métabolites polaires sont éliminés au niveau de la vésicule biliaire (Napoli, 1996, 1999).

Les rétinoïdes sont essentiels tout au long du développement embryonnaire, de façon temps- et concentration-dépendante (Shenefelt, 2010). Chez les vertébrés, l'AR dirige la segmentation (arrangement périodique des vertèbres, précurseurs de la colonne vertébrale) ainsi que le positionnement des somites. Le rétinol est important dans les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose cellulaires et un excès ou une carence peut entraîner la formation de tératome ou encore la mort embryonnaire (Zile, 2001). Par exemple, une hypovitaminose au cours du développement embryonnaire affectera le cerveau postérieur, le système visuel et auditif, les organes dérivant de la crête neurale et la glande thyroïde (Zile, 2001).

4.2 Métabolisme et action intracellulaire de l'AR

La figure 4.2 résume les grandes étapes de la synthèse et la dégradation de l'AR. Le rétinol arrive dans les tissus par la circulation sanguine sous une forme liée à sa protéine de transport RBP. Le complexe est fixé par le récepteur membranaire STRAT6, qui diminue l'affinité du rétinol pour la RBP et permet la dissociation du rétinol qui entre seul dans la cellule. Le rétinol intracellulaire est lié à la protéine CRBP (protéine de liaison du rétinol cellulaire), ensuite transformé en AR par l'action de l'alcool-déshydrogénase et de la rétinaldéhyde-déshydrogénase. L'AR lie une autre protéine intracellulaire, la CRABP (protéine de liaison de l'AR cellulaire) qui permet le transfert de l'AR du cytoplasme au noyau. On retrouve deux isoformes de la CRABP : la CRABP-II, qui contrairement à la

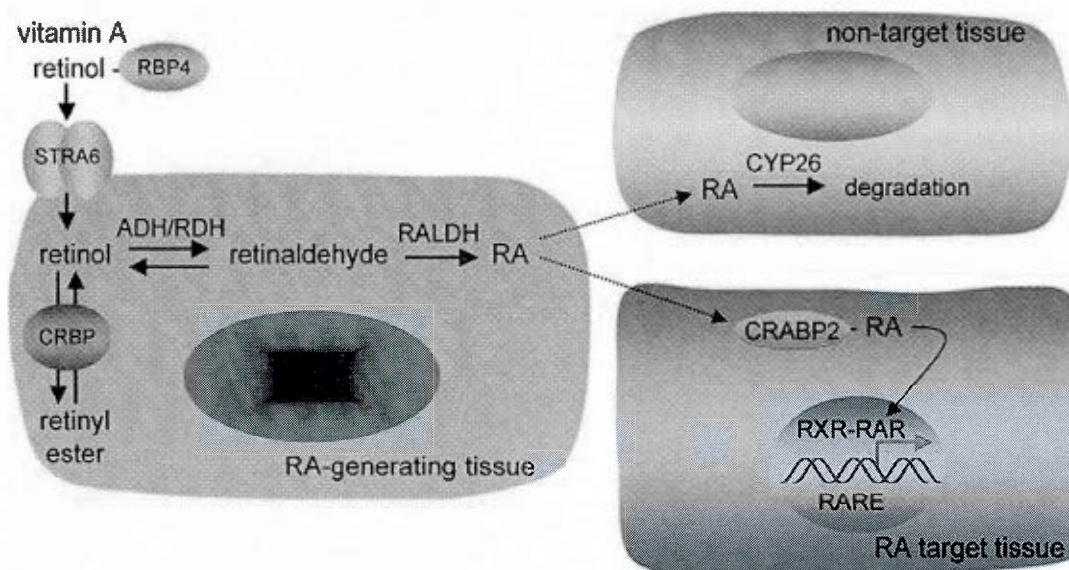


Figure 4.2 Synthèse et signalisation de l'acide rétinoïque L'AR est produit dans des tissus spécifiques comme le foie à partir du rétinol. Le rétinol circulant est lié à la protéine RBP4. Il se dissocie de cette protéine lors de son transfert dans la cellule par la protéine STRA6. Le rétinol est oxydé par l'alcool/rétinol-déshydrogénase (ADH/RDH) pour former le rétinaldéhyde, lequel est ensuite converti en AR par l'action de la rétinaldéhyde-déshydrogénase (RALDH). Le rétinol peut aussi lier la protéine de liaison cellulaire du rétinol (CRBP) pour être entreposé sous la forme d'esters de rétinyl. La liaison de l'AR avec la protéine cellulaire-2 de liaison à l'AR (CRABP2) permet son transfert au noyau et la liaison aux récepteurs de l'AR (RAR). Alternativement, l'AR peut être dégradé via les cytochromes P450 inducibles par l'AR (CYP26) (Duester, 2008 ; Nezzar *et al.*, 2007).

CRABP-I, permet le transfert nucléaire et la liaison des récepteurs à l'AR (RAR). CRABP agit donc comme régulateur de la quantité d'AR entrant dans le noyau et donc de la quantité d'AR génétiquement actif. CRABP serait responsable du gradient d'AR créé dans l'axe antéropostérieur de l'embryon (Duester, 2008 ; Marshall *et al.*, 1996 ; Napoli, 1996 ; Sessler et Noy, 2005). La concentration d'AR est aussi régulée par la transformation d'atRA en métabolites plus polaires via le métabolisme oxydatif suite à la liaison avec CRABP-I. Une des isoformes du cytochrome P450 (CYP450), le cytochrome P26 (CYP26), catalyse l'hydroxylation de l'AR en 4-hydroxy-AR (4-OH-AR). Ce processus d'inactivation est complété par une oxydation en 4-oxo-AR. Le *tout-trans*-4-oxo-AR est susceptible à l'isomérisation naturelle menant à la formation d'autres métabolites polaires comme le *tout-trans*-18-hydroxy-AR (Napoli, 1999 ; Nezzar *et al.*, 2007 ; Roberts *et al.*, 1979). En plus

d'être obtenus à partir de l'atRA, le 4-hydroxy-AR et le 4-oxo-AR peuvent être générés à partir du 9-cis-AR et 13-cis-AR (Lanvers *et al.*, 1996).

4.3 Action nucléaire des rétinoïdes

Les effets de la vitamine A sont principalement dus à la forme atRA via des récepteurs nucléaires spécifiques. Toutefois, le 9-cis-AR peut activer des facteurs de transcription régulant la croissance et la différenciation des cellules saines et malignes (Rubin *et al.*, 1994) et le 13-cis-AR possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-tumorales (Datta et Lianos, 1999 ; Waliszewski *et al.*, 1999). Les rétinoïdes lient deux familles de récepteurs, les récepteurs à l'AR (RAR) et les récepteurs aux rétinoïdes-X (RXR). Selon des épissages alternatifs, les deux familles de récepteurs comprennent chacune trois isoformes : α , β et γ (RAR α , β , γ et RXR α , β , γ). Chacune de ces isoformes est exprimée constitutivement et, en absence de leur ligand, lie l'ADN. Le ligand naturel des RAR est l'atRA et celui des RXR est le 9-cis-AR qui est obtenu par isomérisation de l'atRA (Sucov et Evans, 1995). La régulation transcriptionnelle des gènes cibles de l'AR est reliée à la reconnaissance et l'assemblage coopératif d'hétérodimères RAR/RXR sur des courtes séquences d'ADN appelées éléments de réponse à l'AR (RARE) (Nezzar *et al.*, 2007). Les multiples effets de la vitamine A s'expliquent par le fait que plusieurs gènes ciblés par l'AR sont des gènes impliqués dans différents processus biologiques. De plus, la redondance des récepteurs RAR et RXR montre l'importance de la vitamine A dans le développement.

4.4 La voie non-génomique de l'action de l'AR

De façon classique, les RAR sont des régulateurs de la transcription génique suivant leur activation par leur ligand, généralement l'AR. L'hétérodimérisation RAR/RXR régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires en activant différents facteurs de transcription au niveau nucléaire. L'isoforme alpha des RAR (RAR α) est aussi présent à la membrane plasmique des cellules dans les radeaux lipidiques (*lipids rafts*), des microdomaines enrichis en cholestérol, sphingolipides et diverses molécules signalisatrices comme les récepteurs couplés aux protéines G. Les protéines G transmettent le signal à des molécules effectrices comme la PLC, la protéine-kinase C (PKC)

et la kinase MAPK-P38 (les MAPK sont abordées au chapitre V). L'activation de P38 est rapide (moins de cinq minutes) et implique la dimérisation de RAR α avec la protéine G alpha Q (G α q) (Bruck *et al.*, 2009 ; Piskunov et Rochette-Egly, 2011 ; Rochette-Egly et Germain, 2009).

4.5 Les rétinoïdes dans la différenciation cellulaire

L'implication de l'AR dans le développement de l'embryon fut démontrée par des études sur les bourgeons membranaires. L'ajout d'AR de façon exogène induit la fusion des doigts, la diminution du radius ainsi que des retards de croissance de la squelettogénèse (Ross *et al.*, 2000). En plus de l'AR, les protéines de liaison CRABP et les récepteurs RAR sont présents dans l'embryon en développement (Dolle *et al.*, 1989 ; Kwart *et al.*, 1985). Plusieurs recherches ont montré l'implication de l'AR dans la différenciation des cellules souches en culture. L'utilisation de l'AR sur des cellules souches P19 a des effets différents selon la concentration. À forte concentration (10^{-6} M), les cellules P19 se différencient en neurones et astrocytes. Par contre, à concentrations plus faibles (10^{-7} à 10^{-9} M), l'AR induit la différenciation des P19 en cellules musculaires de type cardiaque (10^{-9} M) et squelettique (10^{-8} M) (Kennedy *et al.*, 2009 ; Rudnicki et McBurney, 1987). L'AR permet aussi d'obtenir des adipocytes et des ostéocytes lorsqu'utilisé à 10^{-6} M sur des cellules ES (Buttery *et al.*, 2001 ; Dani *et al.*, 1997 ; zur Nieden, Kempka et Ahr, 2003). L'AR est aussi morphogénique sur les cellules souches adultes. Il permet la différenciation des MSC en neurones et en ostéocytes (dans ce dernier cas, l'AR agit en synergie avec BMP9) (Anghileri *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2010).

L'atRA et ses isomères physiologiques ou des analogues synthétiques ont été grandement évalués pour contrer la progression tumorale. L'atRA est déjà accepté par la *Food and Drug Administration* (FDA) des États-Unis comme agent de traitement de la leucémie promyélocytique aiguë (Wujcik, 1996). Le 13-cis-AR est décrit comme un agent prometteur dans la lutte au cancer de la thyroïde et des ligands synthétiques des RXR (comme le LGD1069) ont des effets préventifs sur le cancer du sein (revue dans Brtko, 2007). Par contre, les rétinoïdes physiologiques ou synthétiques apparentés à l'AR ont été très peu étudiés dans une optique de différenciation cellulaire.

CHAPITRE V: LES MAPK

5.1 Généralités

Les cellules répondent aux signaux extracellulaires par différentes voies de signalisation intracellulaires comme la cascade de signalisation menant à l'activation (phosphorylation) des protéines de la famille des protéines-kinases activées par des mitogènes (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*). Les protéines de cette famille sont des sérine/thréonine-kinases possédant un site de phosphorylation conservé suivant le schéma selon : Thr – X – Tyr. Il existe trois grandes familles de MAPK (Fig. 5.1) qui se distinguent par l'acide aminé

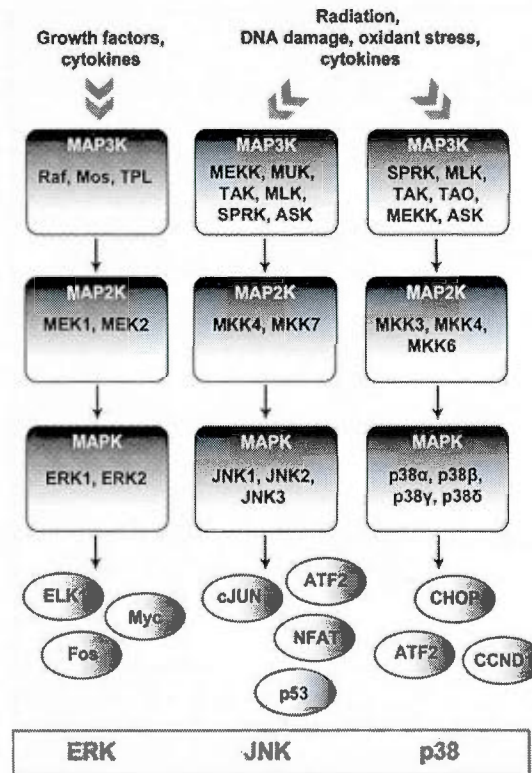


Figure 5.1 Voies d'activation des protéines-kinases. Les MAPK font chacune partie d'une cascade de signalisation constituée de trois participants qui transmettent un signal à partir d'un récepteur membranaire jusqu'à une cible spécifique intracellulaire. Cette cascade de kinases débute par l'activation d'une MAP3K (MEKK) qui phosphoryle une MAP2K (MEK) qui à son tour stimule l'activité d'une MAPK par une double phosphorylation sur un résidu thréonine et un résidu tyrosine. Les trois principaux groupes de MAPKs chez les mammifères sont ERK, JNK et P38 (Geest et Coffey, 2009).

en position X. Une glycine identifie la famille P38, un glutamate la famille ERK, et une proline la famille JNK (Pimienta et Pascual, 2007). Les voies des MAPK peuvent être individuellement ou concomitamment activées. Comme le montre la figure 5.1, l'activation des différentes kinases est variable (facteurs de croissance, cytokines, stress cellulaire, ...) et leur substrat l'est tout autant. Le système de régulation des MAPK est un module de trois kinases ($\text{MAP3K} \rightarrow \text{MAP2K} \rightarrow \text{MAPK}$) impliquées dans le relais d'informations allant de la membrane plasmique vers le noyau où la spécificité des substrats va en augmentant. Par exemple les combinaisons $\text{MAP2K} \rightarrow \text{MAPK}$ sont beaucoup plus spécifiques que celles de $\text{MAP3K} \rightarrow \text{MAP2K}$ (Craig *et al.*, 2008 ; Widmann *et al.*, 1999). Les MAPK agissent principalement sur la survie, la croissance et la différenciation cellulaires en réponse à la présence d'un facteur de croissance, d'une hormone ou d'un neurotransmetteur dans le milieu extracellulaire (Adams, Sachs et Vaillancourt, 2002).

5.2 ERK1 et 2

La voie de signalisation des MAPK la plus étudiée chez les mammifères est celle des kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK) et comporte 5 membres, dont ERK1 et ERK2 sont les plus étudiés. Dans les années 1980, plusieurs études ont démontré qu'une stimulation avec différents facteurs de croissance comme le facteur de croissance des plaquettes (PDGF) ou le facteur de croissance épidermique (EGF) menait à la phosphorylation d'une tyrosine sur une protéine de 42 kDa. Des études subséquentes ont montré que cette phosphorylation pouvait aussi être obtenue suite à une stimulation par l'Ins des cellules 3T3-L1 et qu'une thréonine était aussi phosphorylée. De poids moléculaire respectif de 42 et 44 kDa, ERK1 et 2 (ERK1/2) sont activées par différents agents variant de facteurs de croissance à des agonistes de récepteurs couplés aux protéines G. L'activation de ERK1/2 mène à l'activation de plusieurs facteurs de transcription et d'autres sérine-thréonine-kinases (Ser/Thr-kinases), et contribue à la régulation de la prolifération, de la différenciation, du cycle et de la survie cellulaires. Les isoformes 3, 4 et 5 ont été beaucoup moins étudiées. Elles sont activées par la PKC, l'EGF et le stress oxydatif respectivement. Pour être activées, ERK1/2 nécessitent, comme toutes les MAPK, une double phosphorylation qui se situe pour ces isoformes sur la thréonine 183 et la tyrosine 185 (Widmann *et al.*, 1999).

La voie de signalisation de ERK1/2 débute, dans la cellule, par une activation de Ras qui stimule MAP3K menant à la phosphorylation de MAP2K. MAP2K agit sur ERK1/2 via MEK1 et MEK2 qui ont une activité kinasique sur des résidus de thréonine et de tyrosine situés dans une séquence signalisatrice d'exportation au noyau. Il est proposé que MEK1, dans son état inactif, séquestre ERK1/2 dans le cytoplasme. L'activation phosphorylatrice de MEK1 permet l'activation phosphorylatrice de ERK1/2. ERK1/2 phosphorylées se dissocient de MEK et sont transloquées dans le noyau où elles agissent, entre autres, sur plusieurs facteurs de transcription. MAP3K peut aussi être activée par des récepteurs de type Tyrosine kinase ou couplés à une protéine G (Widmann *et al.*, 1999).

5.3 P38

Chez les mammifères, on retrouve quatre isoformes de P38 (P38 α , P38 β , P38 γ et P38 λ) qui partagent 60% d'homologie entre elles. P38 α et P38 β sont retrouvées dans tous les tissus alors que P38 γ et P38 λ sont spécifiques à certains tissus. Pour être active, P38 doit être phosphorylée par une kinase MKK3, une MAP2K (fig. 5.1), sur la thréonine 180 et la tyrosine 182 (une double phosphorylation est donc essentielle à l'activation). Cette activation de P38 permettra la phosphorylation et l'activation du facteur activateur de transcription-2 (ATF-2) (Fig. 5.1) ainsi que de la protéine-kinase 2 activée par les MAP-kinases (MAPKAPK2/MK2). L'activation de P38 répond à des stimuli extracellulaires comme les rayons UV, le stress oxydatif, les cytokines inflammatoires et les facteurs de croissance (Foltz *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1994 ; Raingeaud *et al.*, 1995). La multitude d'activateurs de P38 montre la complexité de cette voie dépendante non seulement des stimuli, mais aussi du type cellulaire puisque l'Ins augmente la phosphorylation de P38 dans des adipocytes de la lignée 3T3-L1 (Sweeney *et al.*, 1999) et l'inhibe dans des neurones de poussin (Heidenreich et Kummer, 1996).

La kinase P38 agit sur plusieurs substrats permettant à cette voie de jouer une multitude de fonctions complexes et parfois contradictoires. Le premier substrat qui lui fut associé est la MAPKAPK2/MK2. Lorsque MK2 ou MK3 (homologue de MK2) sont activées, plusieurs autres facteurs pourront être activés comme HSP 27, la protéine de liaison à l'élément répondant à l'AMPc (CREB), le facteur de réponse au sérum (SRF) ou encore le ATF1

(Heidenreich *et al.*, 1999 ; Stokoe *et al.*, 1992 ; Tan *et al.*, 1996). P38 peut aussi activer par phosphorylation d'autres facteurs de transcription de la famille ATF ou les facteurs de transcription MEF2C et MEF2A (Widmann *et al.*, 1999).

5.4 JNK

La voie de signalisation de la kinase de la terminaison NH₂ de cJun (JNK) fut identifiée en 1991 par sa spécificité de phosphorylation sur cJun, sur un site NH₂-terminal (Pulverer *et al.*, 1991). JNK est l'homologue humain de la protéines-kinase activée par le stress (SAPK) chez le rat et existe sous 10 isoformes dont les séquences géniques sont réparties sur 3 chromosomes. JNK1 et 2 sont exprimées de façon ubiquitaire contrairement à JNK3 qui se retrouve exclusivement dans le cerveau (Gupta *et al.*, 1996 ; Kyriakis *et al.*, 1994 ; Yang *et al.*, 1997). La JNK est principalement étudiée comme une protéine de réponse au stress et très peu de choses est connue en ce qui a trait à la voie de transduction suivant un stress, un sevrage, des dommages à l'ADN ou la liaison de Fas à la surface de la cellule. Ces stress cellulaires font de JNK un agent impliqué dans l'apoptose, que ce soit via le ligand Fas (FasL) ou la caspase-3 (Widmann *et al.*, 1999). Par contre, JNK peut parfois favoriser la survie et la croissance cellulaires (Widmann *et al.*, 1999).

5.5 Les MAPK dans la différenciation de cellules souches *in vitro*

Les MAPK jouent un rôle important dans la différenciation des cellules. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques durant la période d'induction ou durant la période de maturation peut indiquer un rôle dans l'induction ou la maturation alors que l'inactivation génique ne permet pas de distinguer la période critique d'action. Selon diverses études dans différents types cellulaires, la différenciation neuronale requiert une diminution de la phosphorylation des MAPK ERK et P38 suivie d'une augmentation de leur niveau de phosphorylation (Bost *et al.*, 2002 ; Davidson et Morange, 2000 ; Enarsson *et al.*, 2002 ; Jung *et al.*, 2003). L'adipogenèse et la cardiomyogenèse des cellules souches nécessitent une augmentation de la phosphorylation de ERK dans la période d'induction et une diminution de p-ERK est nécessaire pour générer des adipocytes matures (Bost *et al.*, 2005a ; Eriksson et Leppa, 2002). Par contre, une augmentation de la phosphorylation de P38 est nécessaire pour

obtenir des CM, ce qui n'est pas le cas pour l'adipogenèse (Aouadi *et al.*, 2006b ; Aouadi *et al.*, 2006c ; Davidson et Morange, 2000). La différenciation des cellules P19 en SKM nécessite une diminution de la phosphorylation de ERK suivi de son augmentation (Eriksson et Leppa, 2002). Pour sa part, P38 doit voir sa phosphorylation augmenter pour permettre la fusion des myoblastes en myotubes (Aziz, Liu et Dilworth, 2010 ; Zetser, Gredinger et Bengal, 1999).

Il pourrait avoir un lien entre la signalisation des MAPK, celle de NO et celle de OT. Dans les cellules ES, la cardiomyogénèse spontanée est facilitée par le transfert génique de la NOS ou par une exposition des cellules à un donneur de NO exogène (Kanno *et al.*, 2004). L'action cardiomyogénique de l'OT dans les cellules P19 comme dans les MSC de porc implique aussi l'action du NO (Danalache *et al.*, 2007 ; Ybarra, del Castillo et Troncy, 2011). En effet, la différenciation cardiomyogénique de ces cellules, induite par OT, est diminuée par un inhibiteur des NOS, le L-NAME (Danalache *et al.*, 2007 ; Ybarra, del Castillo et Troncy, 2011). La production de NO est parfois associée à l'activation de ERK1/2 et P38. C'est le cas, par exemple, dans des cellules vasculaires du muscle mou (Doranzo *et al.*, 2011 ; Lepicier *et al.*, 2006). Nous ne connaissons pas l'impact de NO sur ERK1/2 et P38 dans un processus de différenciation myogénique. Alors que l'OT stimule la phosphorylation de ERK1/2 de façon transitoire et rapide sur des cellules myométrales humaines (Wrzal *et al.*, 2012a), nous ne connaissons pas son effet sur les MAPK dans la différenciation cellulaire.

PARTIE II
PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE VI : PROJET DE RECHERCHE

6.1 Problématique

L'infarctus du myocarde est une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. Les thérapies actuelles vont de la prise de médicaments à la transplantation de l'organe entier. Une nouvelle forme de thérapie cardiovasculaire prend de l'ampleur, il s'agit de la thérapie cellulaire. Un volet de ce type de thérapie consiste en l'implantation de cellules afin de recellulariser la zone nécrosée du myocarde par injection directement dans le cœur ou via la circulation systémique. Les premières cellules utilisées pour la thérapie cellulaire furent des types cellulaires similaires aux CM, soient des CM néonataux, des suspensions contenant des cellules ES différenciées en CM ou des cellules satellites du muscle squelettique. Par la suite, des cellules souches non différenciées ont été utilisées, comme des cellules souches de la moelle osseuse (HSC ou MSC) ou des cellules progénitrices retrouvées naturellement dans le cœur (revu dans Guan et Hasenfuss, 2007 ; Liao *et al.*, 2007). L'implantation de cellules souches indifférenciées a souvent amélioré la fonction cardiaque mais très peu de cellules souches demeurent dans le myocarde (Ringe *et al.*, 2002). Pour cette raison, les efforts actuels sont dirigés vers l'implantation de cellules souches pré-dérivées en CM *in vitro* afin d'avoir une meilleure intégration au tissu cardiaque. Les cellules ES présentent l'avantage de la totipotence. Les cellules souches adultes présentent l'avantage de permettre des autogreffes comparativement aux cellules ES. Cependant, les rendements cardiomyogéniques *in vitro* de ces deux types de cellules souches ne dépassent guère 20% (Makino *et al.*, 1999).

L'élucidation des mécanismes de la différenciation cellulaire est nécessaire à la compréhension des processus développementaux. Aussi, la différenciation cellulaire est largement étudiée en utilisant des cellules ES ou EC comme modèles d'investigation. Eventuellement, les connaissances seront transposées aux cellules souches adultes. Les cellules ES et EC peuvent être différenciées en cellules des trois feuillets germinatifs *in vitro*. Les cellules ES et EC se conduisent de façon similaire. Cependant, le maintien en culture des cellules EC, dont les cellules P19 de souris, est moins exigeant. Par exemple, ces cellules, contrairement aux cellules ES, ne nécessitent pas la présence d'une couche de cellules

nourricières, ni l'addition du LIF pour conserver leur phénotype indifférencié. Par sa simplicité de culture et sa similarité avec les cellules ES, le modèle de cellules P19 est un bon modèle pour l'étude du développement précoce chez les mammifères.

Cette thèse veut contribuer à définir les conditions/mécanismes de la différenciation cardiomyogénique en utilisant le modèle cellulaire P19. Un certain nombre de molécules a été identifié comme ayant un pouvoir cardiomyogénique : des vitamines ou leurs dérivés (la vitamine C, l'atRA), des hormones stéroïdiennes (T3), des hormones peptidiques (l'Ins, la dynorphine, l'OT) et des agents non-physiologiques (la 5-azacytidine, le DMSO).

L'atRA est un dérivé liposoluble de la vitamine A et un morphogène essentiel du développement des mammifères. Il induit la différenciation des cellules P19 en neurones, fibroblastes et cellules musculaires de façon concentration-dépendante (Rudnicki et McBurney, 1987). Il induit aussi la différenciation de cellules ES en adipocytes (Dani *et al.*, 1997). L'atRA a aussi des pouvoirs morphogènes sur les cellules souches adultes induisant la différenciation de MSC en neurones (Cho *et al.*, 2005) et en ostéocytes (Malladi *et al.*, 2006). L'atRA se fixe à des récepteurs nucléaires spécifiques appartenant à la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes et comprenant les récepteurs de l'atAR : RAR α , RAR β et RAR γ , et les récepteurs de rétinoïdes RXR α , RXR β et RXR γ (Boudjelal *et al.*, 1997). Dans la différenciation cardiomyogénique des cellules ES, l'atRA se lie à un RAR (revu dans Mark *et al.*, 1997) pour ensuite former un hétérodimère avec un récepteur RXR qui active le facteur de transcription cardiomyogénique GATA4 (Clabby *et al.*, 2003). Les RAR et RXR impliqués dans la différenciation adipogénique sont peu connus (Dani, 1999). Par contre, les RAR et RXR sont essentiels au bon fonctionnement des adipocytes matures (Alvarez *et al.*, 2000). La formation d'un hétérodimère entre un RXR et le facteur de transcription adipogénique PPAR γ est essentielle à la différenciation complète des cellules souches en adipocytes (Lowell, 1999).

L'OT, une hormone impliquée dans la reproduction, les contacts sociaux et l'homéostasie métabolique, a des effets morphogéniques. Elle induit la différenciation de cellules P19 en CM (Paquin *et al.*, 2002) et inhibe la maturation de cellules pré-adipocytaires 3T3-L1 en

adipocytes (Wilson et Hollenberg, 1987). Les adipocytes sont dérivés du même feuillet embryonnaire que les CM, soit le mésoderme. Étonnamment, des agents cardiomyogéniques comme l'atRA, l'Ins et la T3 sont aussi impliqués dans l'adipogénèse (Bani-Yaghoub *et al.*, 2004 ; Dani *et al.*, 1997 ; van der Heyden et Defize, 2003).

Des travaux ont souligné l'importance des MAPK dans l'obtention de phénotypes cellulaires adultes. Le tableau 6.1 résume les connaissances acquises sur l'état de phosphorylation requis ou observé pour ERK et P38 pour la génération de types cellulaires précis à partir de cellules ES et de cellules P19. Ce tableau montre que les connaissances sont incomplètes ou partielles. Pour l'obtention de neurones à partir de cellules P19, ERK et P38 doivent être inactivées (i.e. déphosphorylées) durant la période d'induction et P38 activée (phosphorylée) durant la période de maturation (Davidson et Morange, 2000 ; Laplante, 2004). Une inactivation de P38 suivi de son activation a aussi été observée pour la neurogenèse à partir des cellules ES (Aouadi *et al.*, 2006b ; Binetruy *et al.*, 2007). Lors de la différenciation de cellules ES en adipocytes, une augmentation de la phosphorylation de ERK est requise dans la phase précoce (induction) et une diminution de la phosphorylation dans la phase tardive (maturation) (Bost *et al.*, 2005a ; Bost *et al.*, 2002). Une induction avec l'atRA est essentielle à l'activation de la voie de différenciation adipogénique induite par PPAR γ (Lowell, 1999). L'atRA induit l'activation de ERK et cette voie de signalisation augmente l'expression de PPAR γ . Par contre, la phosphorylation de P38 ne doit pas être stimulée durant la dernière phase de l'adipogénèse (Aouadi *et al.*, 2006c). La différenciation spontanée des cellules ES en CM nécessite l'activation de P38 dans la phase précoce (Aouadi *et al.*, 2006b). L'utilisation du DMSO pour induire la différenciation cardiaque des cellules P19 est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation de ERK et P38 dans la phase précoce (Davidson et Morange, 2000 ; Eriksson et Leppa, 2002). L'induction des cellules P19 avec le DMSO permet aussi de différencier les cellules P19 en cellules musculaire squelettique. Pour ce faire, une diminution de ERK dans la phase précoce doit être suivi d'une augmentation de la phosphorylation de ERK et P38 durant la phase de maturation (Davidson et Morange, 2000 ; Eriksson et Leppa, 2002). Par contre, l'importance des MAPK dans la différenciation myogénique des cellules P19 induite avec l'OT ou l'AR est peu connue.

Dans certaines situations non reliées à la différenciation cellulaire ou dans certains types cellulaires, en particulier les cellules du système reproducteur femelle, l'OT est capable d'induire une phosphorylation de ERK suite à la liaison à son récepteur (Pequeux *et al.*, 2004). Cependant, on ne sait pas dans quelle mesure les MAPK sont impliquées dans l'action cardiomyogénique de l'OT. Tous ces travaux ont été réalisés avec des modèles cellulaires différents et des agents de différenciation différents. Cette thèse avait pour but de clarifier l'implication des MAPK dans la différenciation mésodermique de façon intégrée dans le même modèle cellulaire P19 en utilisant l'atAR ou l'OT comme agent inducteur.

Tableau 6.1 État de phosphorylation requis ou observé pour ERK et P38 dans la différenciation cellulaire.

Voie de différenciation	Modèle cellulaire (agent inducteur)	Période d'induction	Période de maturation
Neurogénèse	P19 (atRA)	p-P38 ↓ p-ERK ↓	p-P38 ↑ p-ERK ↑
	ES (atRA)	p-P38 ↓ p-ERK ?	p-P38 ↑ p-ERK ?
Adipogénèse	ES (atRA)	p-P38 ? p-ERK ↑	p-P38 ↓ p-ERK ↓
Squelettomyogénèse	ES (atRA)	p-P38 ↑ p-ERK ?	p-P38 ? p-ERK ↑
	P19 (atRA)	p-P38 ? p-ERK ?	p-P38 ? p-ERK ?
	P19 (DMSO)	p-P38 ? p-ERK ↓	p-P38 ↑ p-ERK ↑
Cardiomyogénèse	ES (spontané)	p-P38 ↑ p-ERK ?	p-P38 ? p-ERK ?
	P19 (DMSO)	p-P38 ↑ p-ERK ↑	p-P38 ? p-ERK ?
	P19 (atRA)	p-P38 ? p-ERK ?	p-P38 ? p-ERK ?
	P19 (OT)	p-P38 ? p-ERK ?	p-P38 ? p-ERK ?

Une diminution (↓) ou une stimulation (↑) de la phosphorylation est nécessaire au bon déroulement de la période mentionnée. Le point d'interrogation indique une exigence de phosphorylation non connue ou qui diffère selon les études publiées. Les références sont retrouvées dans le texte principal.

6.2 Hypothèse et objectifs

L'AR est reconnu comme un morphogène puissant nécessaire à la formation de tout l'organisme et l'OT a des propriétés myogéniques. Les conditions d'exposition à l'AR et ses analogues (rétinoïdes) ainsi qu'à l'OT pourraient aider à contrôler la différenciation mésodermique en particulier dans la détermination myogénique versus adipogénique. Comme les MAPK apparaissent être impliquées dans diverses voies de la différenciation mésodermique, leur activité pourrait compter parmi les mécanismes d'action de l'OT et de l'atRA. Les objectifs de la présente thèse sont les suivants :

- 1) Notre premier objectif a été d'établir une action mésodermique élargie de l'atRA dans le modèle P19, de déterminer l'influence de l'OT sur cette action et de comparer les pouvoirs myogéniques de l'atRA et de l'OT. En effet, des travaux ont rapporté que l'atRA a une influence mésodermique élargie sur les cellules ES, générant à la fois des adipocytes, des CM et des SKM alors que seule une action myogénique a été mise en évidence dans les cellules P19. D'autre part, l'OT inhibe la maturation de pré-adipocytes.
- 2) Notre deuxième objectif a été de déterminer l'importance des voies RAR et RXR dans l'action mésodermique de l'atRA et l'impact de l'activation spécifique de chacune de ces voies sur les profils de phosphorylation de ERK et P38.
- 3) Notre dernier objectif a été de déterminer l'importance des voies RAR, RXR et MAPK dans l'action myogénique de l'OT et cela en variant la fenêtre temporelle de traitement durant l'induction de la différenciation.

6.3 Approche expérimentale

Voici les grandes lignes des procédures expérimentales utilisées tout au long de la thèse :

- a) Différenciation des cellules P19: La figure 6.1 schématise les deux protocoles de différenciation utilisés dans la thèse. La différenciation des cellules P19 en CM est effectuée avec l'OT comme agent d'induction. Les cellules sont cultivées en suspension pendant quatre jours en présence de 10^{-7} M d'OT puis en adhésion sur support en absence d'agent inducteur pendant dix jours. Ce protocole de base, nommé protocole cardiaque « classique », est le protocole témoin lors de la comparaison des rendements

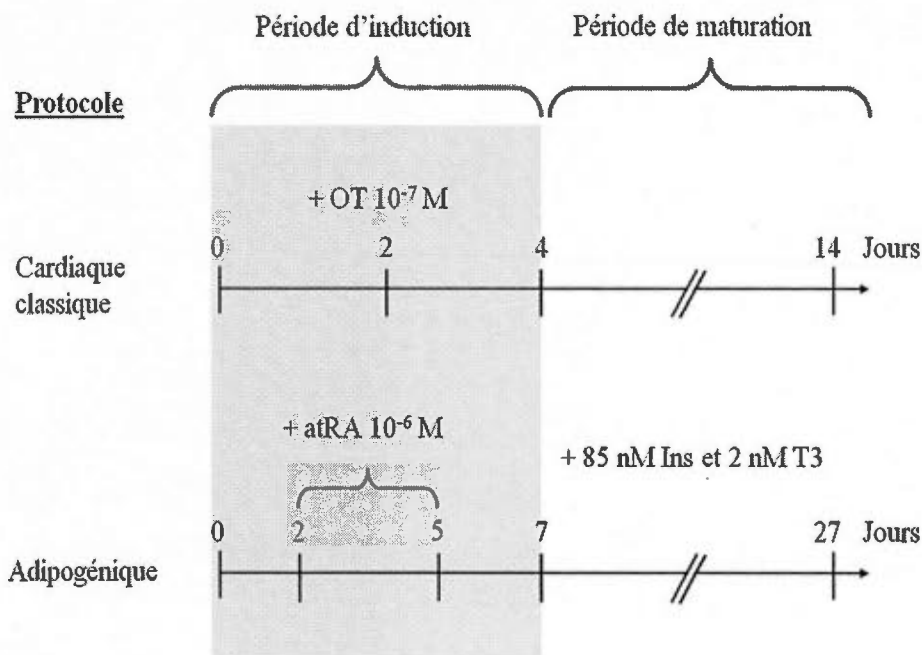


Figure 6.1 Principaux protocoles de différenciation des cellules P19. Les protocoles de différenciation cardiaque classique et adipogénique comportent deux étapes distinctes. La période d'induction (ou d'agrégation) où les cellules sont cultivées en suspension pour permettre la formation d'agrégats (ou corps embryoides), et la période de maturation où les cellules sont transférées en boîtes de culture tissulaire pour permettre leur adhésion au support et le développement du phénotype mature. Le protocole cardiaque classique utilise l'OT seulement durant les quatre jours de la période d'induction et la période de maturation est de 10 jours (J4+10 ou J14). Le protocole adipogénique utilise l'atRA comme inducteur durant les jours deux à cinq de la période d'induction, et le milieu de maturation est composé d'Ins et de l'hormone T3 pour une période de 20 jours (J7+20 ou J27).

cardiomyogéniques. Des SKM sont aussi générés mais en très faible quantité. Le protocole adipogénique comprend une culture de sept jours en suspension avec provision de 10^{-6} M d'atRA des jours deux à cinq. Les agrégats âgés de sept jours sont par la suite cultivés en adhésion en présence de 85 nM d'Ins et de 2 nM de T3. Il est à noter que le protocole adipogénique génère aussi des myocytes comme cela sera démontré dans le chapitre VII.

Pour étudier l'impact des voies RAR, RXR et MAPK, des analogues de l'atRA et des modulateurs pharmacologiques de ERK et P38 ont été utilisés. Un agoniste des RAR et

un agoniste des RXR ont remplacé l'atRA dans le protocole adipogénique. L'atRA ou ses analogues ont été combinés à l'OT dans le protocole cardiaque. Des modulateurs de ERK et P38 ont aussi été combinés à l'OT dans ce protocole. Deux fenêtres temporelles de traitement ont été évaluées, incluant une fenêtre de traitement précoce (J0 à J4) et une fenêtre tardive (J2 à J4). Enfin, les profils de phosphorylation d'ERK ou de P38 ont été analysés par immunobuvardage.

- b) Détermination des rendements myogéniques et adipogéniques: L'examen morphologique des cultures P19 en différenciation a permis la détection de myocytes de types cardiaque et squelettique (présence de colonies battantes/contractiles) et d'adipocytes (présence d'inclusions lipidiques dans les cellules). Les rendements myogéniques et adipogéniques et de non-différenciation résiduelle ont été étudiés par réaction de polymérase en chaîne (PCR), immunobuvardage, cytochimie et cytofluorescence de marqueurs phénotypiques, comme rapporté dans le tableau 6.2. Une partie de ce travail a été réalisée avec des cellules P19CL6-MLC2v-GFP. Ce clone des cellules P19 exprime la protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de la chaîne légère de la myosine 2 ventriculaire (MLC2v). Les cellules fluorescentes GFP dans les cultures en différenciation sont ainsi identifiées comme des CM (Moore *et al.*, 2004).
- c) Général - Analyse statistique: Les études ont été réalisées sur 3 séries cellulaires indépendantes. Les analyses statistiques des données (moyennes \pm écarts-moyens) ont été faites avec le logiciel JMP IN 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les comparaisons entre deux groupes de données ont été réalisées avec le test-t de Student. Une valeur de $P < 0,05$ fut considérée comme significative.

Tableau 6.2 Marqueurs phénotypiques utilisés et leur mesure dans la caractérisation de cellules P19 et leurs dérivées.

Phenotype	Marqueur	Mesure
Cellule souche	Oct3/4	IB
Cardiomyocyte	cTpnI	PCR, IB
	α -Actinine sarcomérique	IB, Cytofluorescence (cellules rondes)
	Protéine rapporteuse GFP	Cytofluorescence
Cellules de muscle squelettique	α -Actinine sarcomérique	IB, Cytofluorescence (cellules longues)
	MyoD	PCR, IB
Adipocyte	Triglycérides	Coloration à l'huile rouge
	PPAR γ	PCR, IB, Cytofluorescence
	aP2	PCR
	LPL	PCR

GFP, protéine fluorescente verte; IB, immunobuvardage; PCR, réaction de polymérase en chaîne.

CHAPITRE VII : SKELETAL AND CARDIAC MYOGENESIS ACCOMPANY ADIPOGENESIS IN P19 EMBRYONAL STEM CELLS

Le travail de ce chapitre a été publié, en 2010, dans *Stem Cells and Development* 18 (7): 1023-32, par Frédéric Bouchard et Joanne Paquin. Certaines parties des résultats ont été présentées sous forme de communications dans des congrès:

- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, Génération de myocytes cardiaques et squelettiques dans la différenciation adipogénique de cellules souches embryonnaires P19. 1^{er} Colloque annuel du Centre Pharmaquam de l'UQAM. Montréal. 16-17 juin 2009.
- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, Génération de myocytes cardiaques et squelettiques dans la différenciation adipogénique de cellules souches embryonnaires P19. 77^e Congrès annuel de l'Association francophone pour le savoir (ACFAS). Ottawa. 11-15 mai 2009.
- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, Génération de myocytes cardiaques et squelettiques dans la différenciation adipogénique de cellules souches embryonnaires P19. 4^e Colloque annuel du Centre de recherches biomédicales de l'UQAM (BioMed). Montréal 30 avril 2008.
- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, L'ocytocine dans la différenciation cardiomyogénique et adipogénique de cellules souches embryonnaires P19. 48^e Réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec (CRCQ). St-Alexis-des-Monts. 21-23 sept. 2006.
- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, L'ocytocine dans la différenciation cardiomyogénique et adipogénique de cellules souches embryonnaires P19. 74^e Congrès annuel de l'ACFAS. Montréal. 15-19 mai 2006.
- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, L'ocytocine dans la différenciation cardiomyogénique et adipogénique de cellules souches embryonnaires P19. 2^e Colloque annuel du Centre BioMed. Montréal. 27 avril 2006.

7.1 Résumé

Les cellules de carcinome embryonnaire P19 ressemblent aux cellules souches embryonnaires (ES) normales. Elles génèrent des myocytes cardiaques et squelettiques en réponse à l'acide rétinoïque (AR) ou à l'ocytocine (OT). Un traitement à l'AR suivi d'une exposition à la triiodothyronine (T3) et à l'insuline induit la différenciation des cellules ES en adipocytes et cellules de muscle squelettique. D'autre part, l'OT (10^{-7} M) a été rapportée comme inhibant la maturation des préadipocytes 3T3. L'objectif du présent travail a été de déterminer si les cellules P19 ont un potentiel adipogénique pouvant être affecté par l'OT. Les cellules ont été traitées avec l'AR (10^{-6} M)/T3+Ins (protocole adipogénique) ou 10^{-7} M OT (protocole cardiomyogénique) et analysées par PCR et par des techniques immunologiques et cytochimiques. Le marquage à l'huile rouge et l'expression de PPAR γ et d'aP2 indiquent la génération d'adipocytes dans les cultures soumises au protocole adipogénique. Des cellules contractiles ont aussi été générées. Les cellules positives pour l' α -actinine sarcomérique et négatives pour la troponine I cardiaque (cTpnI) indiquent la génération de SKM et les cellules positives pour la cTpnI révèlent la génération de CM. Les niveaux de la cTpnI et du marqueur de muscle squelettique MyoD sont similaires dans le protocole adipogénique et cardiomyogénique, mais l'huile rouge n'a marqué aucune cellule dans le protocole cardiomyogénique. L'ajout d'OT 10^{-7} M au protocole adipogénique n'a affecté ni le marquage à l'huile rouge ni l'expression de PPAR γ . Notamment, le marqueur de pluripotence Oct3/4 est disparu dans le protocole adipogénique mais est demeuré exprimé dans le protocole cardiomyogénique. Les cellules P19 ont donc un potentiel adipogénique non affecté par l'OT 10^{-7} M. La combinaison AR/T3+Ins génère un large spectre de dérivées cellulaires mésodermiques et est un traitement morphogénique plus puissant que l'OT. Les cellules P19 pourraient aider à l'investigation des mécanismes de détermination cellulaire durant le développement.

Manuscript

Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells

Frédéric Bouchard, Joanne Paquin*

Département de chimie-biochimie and Centre BioMed, Université du Québec à
Montréal,
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8

Running title: Adipogenesis in P19 cells

*Corresponding author: J. Paquin (paquin.joanne@uqam.ca), Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8. Phone: (1) 514-987-3000 (ext. 4990). Fax: (1) 514-987-4054.

Abbreviations: Adipo, adipogenic; Cardio, cardiogenic; cTpnI, cardiac troponin inhibitor; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; EC, embryonic carcinoma; ES, embryonic stem; α MEM, alpha-modified Eagle's minimal essential medium; MSC, mesenchymal stem cells; NI, non-induced; OT, oxytocin; PBS, phosphate buffer saline; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR; PPAR, peroxisome proliferator activated receptor; RA, *all-trans* retinoic acid; RT, reverse transcription; SDS, sodium dodecylsulfate; T3, triiodothyronine; TBS, Tris buffer saline.

7.2 Abstract

P19 embryonic carcinoma cells resemble normal embryonic stem cells (ES). They generate cardiac and skeletal myocytes in response to retinoic acid (RA) or oxytocin (OT). RA treatment followed by exposure to triiodothyronine (T3) and insulin induces ES cells differentiation into adipocytes and skeletomyocytes. On the other hand, OT (10^{-7} M) was reported to inhibit 3T3 preadipocyte maturation. The present work was undertaken to determine whether P19 cells have an adipogenic potential that could be affected by OT. Cells were treated with RA (10^{-6} M)/T3+insulin (adipogenic protocol) or 10^{-7} M OT (cardiomyogenic protocol), and analysed by PCR, immunotechniques and cytochemistry. Oil-Red-O staining and expression of PPAR γ and aP2 indicated the generation of adipocytes in cultures submitted to the adipogenic protocol. Contracting cells were also generated. Cells positive for sarcomeric actinin and negative for cardiac troponin inhibitor (cTpnI) indicated generation of skeletal myocytes, and cTpnI positive cells revealed generation of cardiomyocytes. Levels of cTpnI and of the skeletal marker MyoD were almost similar in both protocols whereas no Oil-Red-O staining was associated with the cardiomyogenic protocol. Addition of 10^{-7} M OT to the adipogenic protocol did not affect Oil-Red-O staining and PPAR γ expression. Interestingly, Oct3/4 pluripotency marker disappeared in the adipogenic protocol but remained expressed in the cardiomyogenic one. P19 cells have thus an adipogenic potential non affected by 10^{-7} M OT. RA/T3+insulin combination generates a larger spectrum of mesodermal cell derivatives and is a more potent morphogenic treatment than OT. P19 cells could help investigating mechanisms of cell fate decision during development.

7.3 Introduction

Embryonic stem (ES) cells, derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, hold great promise in cell replacement therapies since they can generate many, if not all, cell types of the organism. For instance, efforts are invested in developing protocols that drive differentiation of ES cells into cardiomyocytes *in vitro* for subsequent engraftment into the heart, with the hope of successfully treat cardiac diseases. Various conditions and molecules have already been found as stimulating cardiomyogenic differentiation of ES cells as well as

embryonic carcinoma (EC) cells which are ES cell siblings. Structurally very different molecules revealed to be cardiomyogenic. Dimethylsulfoxide, although a non physiological solvent, is a potent inducer (Rudnicki et McBurney, 1987). Among physiologically relevant inducers are: nitric oxide (Kanno et al., 2004); steroid/vitamin molecules including retinoic acid (RA), triiodothyronine (T3), ascorbic acid (Rodriguez *et al.*, 1994 ; Rudnicki et McBurney, 1987 ; Takahashi *et al.*, 2003); the peptide hormones dynorphin, oxytocin (OT), to some extent endothelin (Gassanov *et al.*, 2004 ; Hatami, Valojerdi et Mowla, 2007 ; Paquin *et al.*, 2002 ; Ventura et Maioli, 2000); and growth factors such as bone morphogenic factors and growth fibroblast factors (Yoon et al., 2005). Most often ES and EC cells are treated with inducing agents while being cultivated as floating aggregates called embryoid bodies. Generally ES and EC cells respond in a similar manner to treatment with inducers although conditions for routine propagation are different. ES cells must be cultivated on embryonic feeder cells and in the presence of differentiation inhibitory factors to maintain their undifferentiated character; the removal of these conditions induces spontaneous differentiation into cardiomyocytes. EC cells, such as the mouse P19 cells used in the present work, remain undifferentiated without the help of feeder cells or inhibitory factors, and do not spontaneously generate cardiomyocytes.

Efficiency of cardiac differentiation of ES and EC cells *in vitro* is still not optimal using one or the other agents, with yields varying around 5% and reaching perhaps 20% in some cases of co-culture systems (Danalache *et al.*, 2007 ; Graichen *et al.*, 2008 ; Guan et Hasenfuss, 2007 ; Xu *et al.*, 2008). There is a lack of comparison between efficiencies of different protocols and efforts to fill this gap could help in the fine tuning of the more promising approaches. In the P19 model, order of cardiomyogenesis efficiency was OT (10^{-7} M) \geq dimethylsulfoxide (0.5-1% v/v) $>$ RA (10^{-8} - 10^{-7} M) when these agents were added to cultures during the entire period of cell aggregation (Jankowski *et al.*, 2004 ; Paquin *et al.*, 2002). Skeletal muscle cells are also generated with cardiomyocytes in these cultures (Danalache *et al.*, 2007 ; Rudnicki et McBurney, 1987). It is worth of note that exposure of P19 cells to higher RA concentration (10^{-6} M) over the aggregation period generates neurons but not muscle cells (Laplante, Beliveau et Paquin, 2004 ; Poirier *et al.*, 2006 ; Rudnicki et McBurney, 1987 ; Skerjanc et McBurney, 1994). Interestingly application of such high RA

concentration at midterm instead of beginning of the cell aggregation period followed by exposure to T3 and insulin was shown to induce differentiation of ES cells into adipocytes and skeletomyocytes, and perhaps into cardiomyocytes also although generation of this last cell type was not demonstrated (Dani, 1999). On the other hand, OT (10^{-7} M) was reported to inhibit insulin-stimulated maturation of mouse 3T3-F442A preadipocytes into adipocytes (Wilson et Hollenberg, 1987). Altogether these findings suggest that modifying combinations and temporal applications of differentiation agents can influence the balance of differentiated cell types produced. The present work was undertaken to determine whether P19 cells have an adipogenic potential that could be influenced by OT while using RA, insulin and T3 as the differentiating treatment, and to compare the cardiomyogenic yield of RA/insulin/T3- and OT-based differentiation protocols.

7.4 Materials and methods

7.4.1 Culture and differentiation of P19 cells

Cells were routinely cultured at 37°C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂, and in a propagation medium consisting of alpha-modified Eagle's minimum essential medium (α MEM; Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada), 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin (Invitrogen) (Paquin et al., 2002). Passages were done every two days using trypsin and EDTA to detach cells. Adipogenic differentiation protocol (Adipo) was adapted from that developed by Dani *et al.* with mouse ES cells (Dani et al., 1997). P19 cells were grown in hanging drops of 20 μ L containing 1000 cells in propagation medium from day zero (D0) to D2. The aggregates formed were transferred into bacteriological grade-plates where they were cultured in suspension for three days, in propagation medium supplemented with 10^{-6} M all-*trans* retinoic acid (RA; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and renewed every day. Aggregates were maintained in suspension for another two days in absence of RA (D5 to D7), and then as adherent cultures for 20 days (D7+20) following transfer to tissue culture grade-plates. During this post-aggregation period, cells were incubated in adipogenic medium consisting of propagation medium supplemented with 85 nM insulin and 2 nM triiodothyronine (T3) (Sigma-Aldrich).

Adipogenic medium was renewed every second day. The OT-based cardiomyogenic protocol (Cardio) was done according to the procedure of Paquin *et al.* (Paquin *et al.*, 2002). Briefly, cells were cultured as suspended aggregates for 4 days (D0 to D4) in propagation medium containing 10^{-7} M OT, and as adherent cultures for the next 20 days (D4+20) in absence of OT. In some studies, OT (10^{-7} M) was added to the culture medium during the 20 days post-aggregation. Non-induced (NI) cultures were subjected to aggregation and post-aggregation procedures but in absence of inducing agents.

7.4.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies), UV-quantified and diluted in diethylpyrocarbonate treated-water to a concentration of $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Integrity of total RNA and absence of DNA contamination in extracts were verified by electrophoresis in 1% agarose gels. Reverse transcription (RT) was done using an Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and oligo-dT (Amersham Biosciences, Oakville, ON, Canada). Reactions ran 1 h at 37°C followed by 5 min inactivation at 95°C . Semi-quantitative PCR amplifications were done on a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada) using a Taq PCR Core kit (Qiagen), the cDNA and $0.5 \mu\text{M}$ of combined forward and reverse specific primers (Invitrogen). Conditions for RT-PCR analysis of mouse peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ), aP2 (also named fatty acid binding protein-4) and 18S RNA are given in Table 7.1. In all cases, the annealing temperature was 54°C and the number of cycles used was within the linear range of amplification. PCR products were quantified by densitometry with the Chemilmager 5500TM (Alpha Innotech, Californie, USA) following electrophoresis in 1.5% agarose gels containing $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide. Quantitative, real-time PCR (qPCR) amplifications were done on a LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using a QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen), the cDNA and $0.5 \mu\text{M}$ of combined forward and reverse specific primers (Invitrogen). Primer sequences and qPCR conditions are detailed in Table 7.2. Fifty cycles enabled development of the exponential amplification phase and quantification was then performed using the RelQuant software (Roche Diagnostics). Size and purity of the qPCR products were verified on agarose gels.

Absence of DNA contamination was verified by amplifying total RNA samples not subjected to reverse transcription.

7.4.3 Immunocytochemistry

Cells grown onto gelatin coated-coverslips were fixed for 20 min in phosphate buffer saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde, rinsed in PBS and stored at 4°C in this buffer until analysis. Cells were permeabilized for 10 min in PBS containing 1% Triton X-100, blocked for 60 min in PBS containing 1.5% horse serum, successively incubated with the primary and secondary antibodies (60 min each), and mounted for microscopy. Cell washes and antibody dilutions (1/50) were done with PBS containing 1.5% horse serum. In some cases, cells were counterstained during 15 min with 6.25 µg/mL 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in water before mountage. The primary antibodies rabbit anti-PPAR γ (H-100) and goat anti-cTpnI (D-12) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) while mouse anti-sarcomeric (skeletal and cardiac) α -actinin (clone EA-53) was from Sigma-Aldrich. Each of these antibodies gave a unique immunoreactive band by Western blotting. Appropriate fluorescein-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Phase contrast and corresponding fluorescent micrographs were taken with a Retiga 1300 camera (QImaging) using a Nikon Eclipse TE2000-U microscope equipped for epifluorescence. High magnification (630X) DIC (differential interference contrast) and fluorescent micrographs were taken with a Leica DFC350FX camera, using an upright Leica DM5500B microscope.

7.4.4 Oil-Red-O staining

Cell cultures were fixed for 30 min in PBS containing 4% paraformaldehyde, rinsed in PBS, covered for 3 min with 100% propylene glycol and then for 60 min with Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) diluted to 0.5% w/v in 60% isopropanol, rinsed for 1 min with 60% propylene glycol and dried at 37°C for 60 min. Dye retained by cells was extracted with isopropanol and measured by absorbance at 510 nm. Cultures were then counterstained with Crystal violet (absorbance at 595 nm (Laplane, Beliveau et Paquin, 2004)) to correct Oil-Red-O values for variations in cell culture densities.

7.4.5 SDS-PAGE and immunoblotting

Cells were washed with PBS, lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)) containing protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich), and stored at -20°C until analysis. Protein concentration was estimated with a Micro BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Protein aliquots (25 µg, except 60 µg for cTpnI) were loaded onto 10% (12% for cTpnI) SDS-polyacrylamide gels, electrophoresed for 90 min at 150 V using a MiniProtean TetraCell system (BioRad, Hercules, CA, USA), and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for 30 min, at 15 V, using a Trans-Blot SD apparatus (Biorad). Membranes were blocked (overnight at 4°C) in Tris buffer saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 and 3% non-fat dry milk, and successively probed (60 min each time) with primary antibody (dilution 1/1000) and secondary antibody (dilution 1/10000). Antibody incubations and membrane washes were done in TBS containing 0.1% Tween-20. Immune complexes were revealed by incubation of membranes with ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, ON, Canada) and exposition to HyBlot CLTM films (Denville Scientific, Toronto, ON, Canada). Films were analysed by densitometry using a Chemilmager 5500TM scanner (Alpha Innotech). Rabbit anti-MyoD (M-318) and anti-Oct3/4 (H-134) antibodies were from Santa Cruz. Membranes were reprobbed with mouse monoclonal anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich) or rabbit anti-α/β-tubulin antibody (Cedarlane Laboratories, Hornby, ON, Canada) for standardization. The source of the other primary antibodies was as indicated in the *Immunocytochemistry* section. Secondary antibodies, conjugated to horseradish peroxidase, were from Jackson ImmunoResearch Laboratories or Biosource International (Camarillo, CA, USA).

7.4.6 Statistics

The JMP IN 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for statistical analysis. Means between cell populations were compared using Student's *t*-test (significance level $p < 0.05$). Results were obtained from three independent cell series.

7.5 Results

7.5.1 RA, insulin and T3 induce adipogenesis in P19 cells

Similar to mouse ES cells (Dani et al., 1997), P19 cells can differentiate into adipocytes when treated with RA, insulin and T3. Indeed, photomicrographs of differentiated P19 cultures show the presence of cells filled with lipid droplets that can be stained with the triglyceride dye Oil-Red-O (Figs 7.1B and D). Such droplets were absent in undifferentiated cultures (Figs 7.1A and C) as well as in NI cultures (not shown). Gene expression of PPAR γ transcription factor and of aP2, two established adipocyte markers, were higher in differentiated (D7+20) than in undifferentiated cultures (Fig. 7.1F). Adipocytes developed until D20 post-aggregation (D7+20) as indicated by kinetic analysis of Oil-Red-O staining (Fig. 7.1E) and marker gene expression (Fig. 7.1F). The kinetic protein profile of PPAR γ from D7+5 to D7+20 resembled its gene profile (Fig. 7.1G). Surprisingly however PPAR γ immunoblots showed higher signals in undifferentiated than differentiated cultures. We suspected that difference in subcellular localization of PPAR γ rather than mere expression of this factor could better match gene expression and staining data. This was found to be the case by immunocytofluorescence. While the immunoreactive signal was faint and extranuclear in undifferentiated cells (Figs 7.1H'-H'''), there was strong nuclear expression of PPAR γ in Adipo cultures (Figs 7.1I'-I''') in line with genomic activity associated with cell differentiation. The reason for better detection of PPAR γ before than during adipogenesis by Western blotting is not clear for the moment. One explanation could be that affinity of the antibody is affected by the phosphorylation status of the transcription factor. This reason would be well adjusted with the fact that phosphorylation regulates PPAR γ translocation between the nuclear and cytoplasmic compartments (Burgermeister *et al.*, 2007 ; Burgermeister et Seger, 2007).

7.5.2 Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis

In P19 cultures subjected to the Adipo protocol, cellular fibers also appeared, most often localized beside or underneath adipocytes (Fig. 7.2A). These fibers were contracting as shown on a video (supplemental Fig. 7.1S), suggesting contractile muscle cells of the skeletal type. In line with this, differentiated cultures expressed sarcomeric α -actinin by

immunoblotting (Fig. 7.2B). Level of this marker had increased 6-fold at D7+5 in comparison with undifferentiated cultures, and increased until D20 post-aggregation (D7+20). In addition to fibers, there was another subpopulation of beating cells in the Adipo cultures. These later cells displayed a rounded morphology as shown on a supplemental video (Fig. 7.2S), raising the possible generation of cardiomyocytes. This was further investigated by immunocytofluorescence. Figs 3E and F-F" show phase contrast and fluorescence fields containing fibers and rounded cells positive for sarcomeric α -actinin. Multinucleation (Figs 7.3F' and F") and absence of staining for the cardiac marker cTpnI (Figs 7.3G and H) support the skeletal muscle nature of fibers. On the other hand cTpnI antibody stained rounded cells, indicating the generation of myocytes of the cardiac type in Adipo cultures (Figs 7.3I,J,J'). The cardiac specificity of the cTpnI antibody was verified by immunoblotting. Heart extracts but not skeletal muscle extracts displayed an immunoreactive signal (not shown). Notably, undifferentiated cultures were negative for both sarcomeric α -actinin and cTpnI markers (Figs 7.3A-D).

7.5.3 Comparison of cardiomyogenesis in adipogenic and OT-based protocols

OT added at 10^{-7} M concentration in the culture medium of P19 cells during aggregation (a treatment referred to as Cardio protocol here) was shown to act as a cardiomyogenic agent, more potent than 0.5% dimethylsulfoxide or 10^{-8} - 10^{-7} M RA (Jankowski *et al.*, 2004 ; Paquin *et al.*, 2002). Considering that the Adipo protocol can generate cardiomyocytes, we compared its cardiomyogenic yield with that of the Cardio protocol by measuring expression of cTpnI marker. Data from qPCR (Fig. 7.4A) and Western blotting (Fig. 7.4B) analysis showed similar levels of cTpnI expression in both differentiation protocols. Addition of OT post-aggregation did not upregulate cTpnI expression.

7.5.4 Comparison of skeletomyogenesis in adipogenic and OT-based protocols

In addition to cardiomyocytes, the OT-based Cardio protocol also generates some skeletomyocytes (Danalache *et al.*, 2007). We therefore compared the skeletomyogenic yield of the Adipo and Cardio protocols using the transcription factor MyoD as a marker. MyoD gene expression was about 1.5 fold higher in the Cardio than in the Adipo protocol by qPCR

analysis (Fig. 7.4C). A similar result was obtained when MyoD expression was analyzed by Western blotting (Fig. 7.4D). Post-aggregation OT had no significant influence on MyoD expression in both Adipo and Cardio protocols.

7.5.5 Comparison of adipogenesis in adipogenic and OT-based protocols

The Adipo and Cardio protocols were also compared for adipogenesis efficiency. In contrast to Adipo cultures, cells containing lipid droplets and specific Oil-Red-O staining were not detected in Cardio cultures (Fig. 7.5A-C). While both protocols had similar PPAR γ mRNA levels (Fig. 7.5D), they differed in the subcellular localization of PPAR γ by immunocytofluorescence. PPAR γ signal was strong and nuclear in Adipo cultures (Figs 7.1I-I'') but faint and extranuclear in Cardio cultures (Figs 7.5E'-E''). The Cardio cultures thus resembled undifferentiated P19 cells (Figs 7.1H-H'') with respect to PPAR γ distribution. Altogether the data indicated that the Cardio protocol did not provide adipogenic conditions. Addition of OT post-aggregation changed neither Oil-Red-O staining intensity nor PPAR γ gene expression (Figs 7.5A and D).

7.5.6 Expression of Oct3/4 pluripotency marker in adipogenic and OT-based protocols

Finally, we compared the general efficiency of Adipo and Cardio protocols to induce loss of pluripotency in P19 cells. Oct3/4 was chosen as the stemness marker because this transcription factor, expressed in P19 cells and a variety of stem cells (Okamoto *et al.*, 1990 ; Palmieri *et al.*, 1994 ; Scholer *et al.*, 1989), belongs to the group of few transcription factors which, upon introduction into somatic cells, can induce their reprogramming to an embryonic-like state (Takahashi *et al.*, 2007). Oct3/4 protein, highly expressed in undifferentiated P19 cells, was downregulated to undetectable levels in Adipo cultures (Fig. 7.6). In contrast, although Oct3/4 level decreased in Cardio cultures compared to undifferentiated cultures, it was still present in sizeable quantities. The Adipo protocol thus appears as providing more efficient morphogenic conditions than the Cardio protocol.

7.6 Discussion

This is the first study showing that P19 cells can differentiate into adipocytes when triggered with RA and further exposed to insulin and T3. Adipogenesis was also accompanied by the generation of skeletomyocytes. This is interesting since muscle and adipose tissues develop from the same mesodermal precursor cell. Such intimate relationship continues beyond embryonic development. For example, adipogenic potential can be transiently activated in skeletal muscle stem cells during muscle regeneration (Wagatsuma, 2007). Another muscle type, the cardiac type, was also generated by the Adipo protocol based on the expression of cTpnI (Figs 7.3 and 7.4) and GATA4 (not shown). Both sarcomeric muscle cell types were found together following stem cell treatment with various differentiation inducers, including RA, dimethylsulfoxide or OT (Paquin *et al.*, 2002 ; Rudnicki et McBurney, 1987). RA and T3 were already known as cardiomyogenic factors. The present results point to the differential effects a morphogen could exert on cell phenotypal fates upon changing its concentration or application time. For instance, RA applied at 10^{-6} M throughout aggregation induces neuroectodermal differentiation whereas at lower concentration (10^{-7} - 10^{-8} M) or at the same high concentration but with application at midterm of aggregation, it induces mesodermal differentiation. The latter strategy was more efficient with respect to the myogenic yield. T3 applied alone during P19 cell aggregation was reported to be cardiomyogenic but no indication was provided on its skeletomyogenic potential in this cell model (Rodriguez *et al.*, 1994). Under conditions of the Adipo protocol, the presence of T3 in the culture medium of ES cells following RA treatment was found necessary to sustain adipogenesis but the extent to which this hormone was required for myocyte generation has not been determined (Dani, 1999 ; Dani *et al.*, 1997). Interestingly, although skeletomyocytes were identified in both the Cardio and Adipo protocols, we observed that the latter was more potent in stimulating organization of these cells into fibers. This is in accordance with T3 controlling myoblast division, differentiation and fusion into myotubes in various animal species (Anderson *et al.*, 1998 ; Marchal *et al.*, 1995 ; Shibota *et al.*, 2000).

Insulin has been shown to sustain adipogenesis. When used at 10^{-7} M it increased the conversion of 3T3 pre-adipocytes into adipocytes as evidenced by increased rate of glucose

uptake and triglyceride synthesis (Wilson et Hollenberg, 1987). Combined to other agents (e.g. dexamethasone), this hormone, at 10^{-7} M concentration, induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) into fat cells (Miki *et al.*, 2001 ; Tropel *et al.*, 2004) whereas at much higher concentration (10^{-4} M), it can stimulate apparition of cardiomyocyte markers (Shim *et al.*, 2004). Contrasting results were however reported with respect to a potential myogenic action of insulin. Neural stem cells cultivated in the presence of 10^{-7} M insulin generated cardio- and skeletomyocytes in addition to neuroectodermal derivatives (Bani-Yaghoub *et al.*, 2004). Oppositely, the same concentration of insulin on human ES cells cocultured with endodermal-like cells diminished cardiomyogenesis while stimulating neurogenesis (Freund *et al.*, 2008). Action of insulin on cell differentiation thus appears to be influenced by the hormone concentration and the cell background (e.g. the extent of a cell predetermination towards a specific lineage, the presence of other cell types in cultures).

OT was shown to interfere with maturation of mouse 3T3 preadipocytes into fully differentiated adipocytes. This effect was however observed with maturation stimulated by 10^{-7} M insulin and little with spontaneous maturation (Wilson et Hollenberg, 1987). Recently, OT, at 10^{-8} M, was shown to reduce the ability of MSC to differentiate into adipocytes, increasing the yield of osteocytes (Elabd *et al.*, 2008). With a similar insulin background (10^{-7} M) in our Adipo protocol, OT added at 10^{-7} M did not inhibit adipogenesis. Besides the different cell models, it is possible that RA and T3 could have overcome OT influence in the P19 model. The fact that the OT-based Cardio protocol did not generate adipocytes agrees with the neutral or inhibitory effect of OT on adipogenesis. OT can be considered as an established myogenic morphogen. It induces differentiation of myoepithelial cells in the mammary gland (Sapino *et al.*, 1993), and cardiomyogenesis in P19 cells (Paquin *et al.*, 2002) and cardiac stem cells (Matsuura *et al.*, 2004). In the P19 model, skeletomyocytes were also observed in OT-differentiated cultures (Danalache *et al.*, 2007). In the present study, prolongation of OT treatment in the Cardio protocol or addition of OT in the Adipo protocol did not increase the yield of cardiomyocytes based on the expression of cardiac markers. This would be in line with the findings of Hatami *et al* whereby, in mouse ES cells, OT acts mainly, if not only, during early steps of cardiomyogenesis (Hatami, Valojerdi et Mowla, 2007).

It is worth noting that the Adipo but not the OT-based Cardio protocol extinguished expression of the stemness marker Oct3/4. Expression of SSEA-1, another embryonic marker, was also reported to be expressed in the Cardio cultures (Danalache et al., 2007). This observation may be of practical interest in cell implantation. Indeed, absence of undifferentiated cells would decrease the risk of teratoma development.

In conclusion, P19 cells can differentiate into adipocytes, skeletomyocytes and cardiomyocytes upon combination of RA, insulin and T3. Varying the concentration and the application time of these agents may help to delineate conditions and mechanisms of cell fate decisions during development. It can also help in establishing conditions to upscale cardiomyocyte formation from ES cells for cell replacement therapy.

7.7 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant NET SRD-63193). We wish to thank Drs Borhane Annabi and Sarah Jenna (Département de chimie et de biochimie, Université du Québec à Montréal, Canada) for the use of microscope facilities.

7.8 Tables and Figures

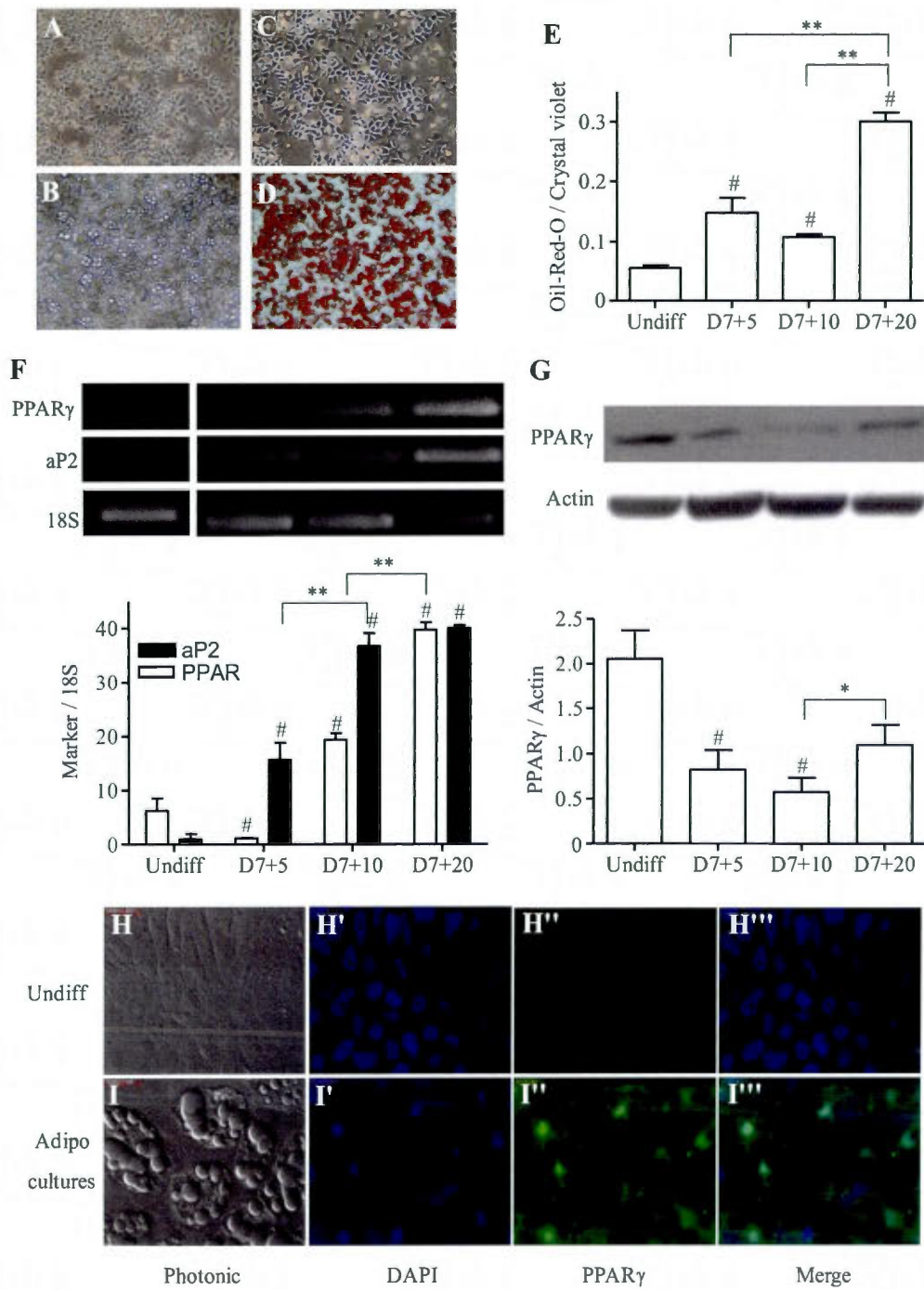
Table 7.1 Semi-quantitative PCR conditions

Primer name	Sequence	Nb cycles	Product size (bp)	Reference
18S	Sense: cggctaccacatccaaggaa Antisense: gctggaattaccgcggct	25	187	(Fujita et al., 2005)
aP2	Sense: ccgcagacgacagga Antisense: ctcatgccctttcataaact	30	177	(Fujita et al., 2005)
PPAR γ	Sense: ccagagtctgctgatctgcg Antisense: gccacctcttgctctgctc	27	217	(Fujita et al., 2005)

Table 7.2 qPCR conditions

Primer name	Sequence	Temperature of annealing (°C)	Product size (bp)	Reference or accession number
β -Actin	Sense: gccctggctcctagcacc Antisense: ccaccaatccacacagagtactgg	60	74	(Krook et al., 2002)
GAPDH	Sense: cgaccccttcattgacctcaac Antisense: ctccacgacatactcagcacc	55	190	(Liu et al., 2005)
cTpnI	Sense: tgcagattgcgaagcaggagat Antisense: tctgaagctcttcaaagccca	60	124	NM_009406
MyoD	Sense: aactgtccttcgaagccgt Antisense: ttcgctgtgagccgcatgaaa	60	150	NM_010866
PPAR γ	Sense: ccagagtctgctgatctgcg Antisense: gccacctcttgctctgctc	55	217	(Fujita et al., 2005)

Figure 7.1 P19 cells can differentiate into adipocytes. Undifferentiated (Undiff) cells and cells subjected to the Adipo protocol were analysed for morphology and marker expression. Phase contrast micrographs (100X) of undifferentiated cells (**A**) and D7+20 differentiated cultures (**B**). Oil-Red-O stained counterparts are shown on the right (**C,D**). Histograms (means \pm SEM) of Oil-Red-O signal standardized by Crystal violet staining at different times of the differentiation protocol for three independent cell series (**E**). (**F**) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PPAR γ and aP2 markers: gel specimens, and densitograms (means \pm SEM) obtained from three independent cell series. Markers were standardized to 18S RNA signal. (**G**) PPAR γ immunoblotting: blot specimen, and densitograms (means \pm SEM) obtained from three independent cell series. PPAR γ was standardized to actin signal. Photonic (DIC optics) and fluorescent micrographs (630X) of undifferentiated cells (**H-H'''**) and D7+20 differentiated cells (**I-I'''**) stained for DAPI and PPAR γ . The symbols # indicate significant differences with Undiff ($p < 0.05$), while * and **, indicates significant difference ($p < 0.05$) and highly significant differences ($p < 0.01$) between differentiation days. Une version électronique est fournie (CD).



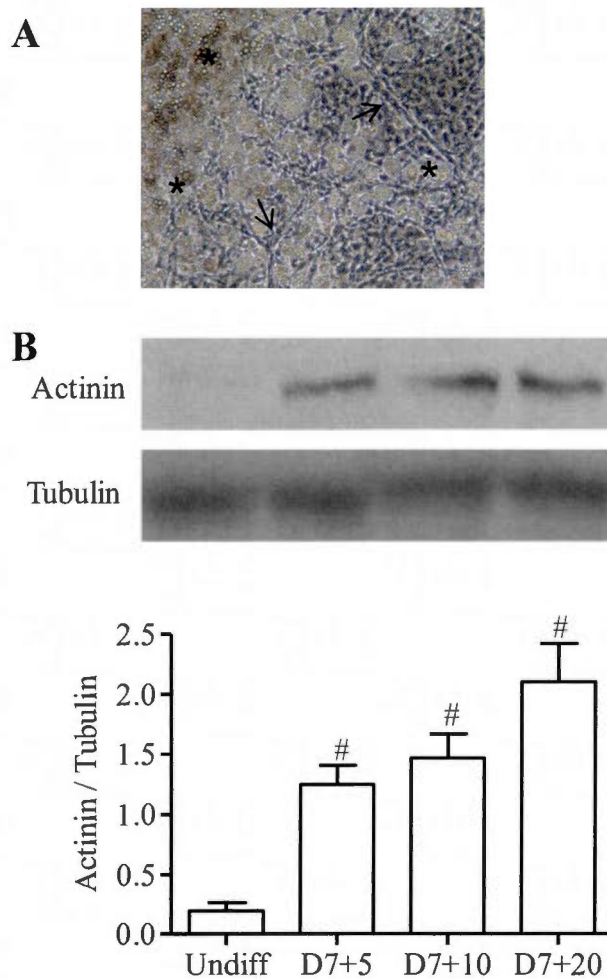


Figure 7.2 Contractile cells are found beside adipocytes. (A) Phase contrast micrograph (100X) focusing on fiber cells (arrows); the field also contains adipocytes (asterisks, out of focus). Actively contracting fibers are shown on a video (Fig. 1S, supplementary material). (B) Sarcomeric actinin immunoblotting at different times of the Adipo protocol: blot specimen, and densitograms (means \pm SEM) obtained from three independent cell series. Sarcomeric actinin was standardized to tubulin signal. The symbols # indicate significant differences with Undiff ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

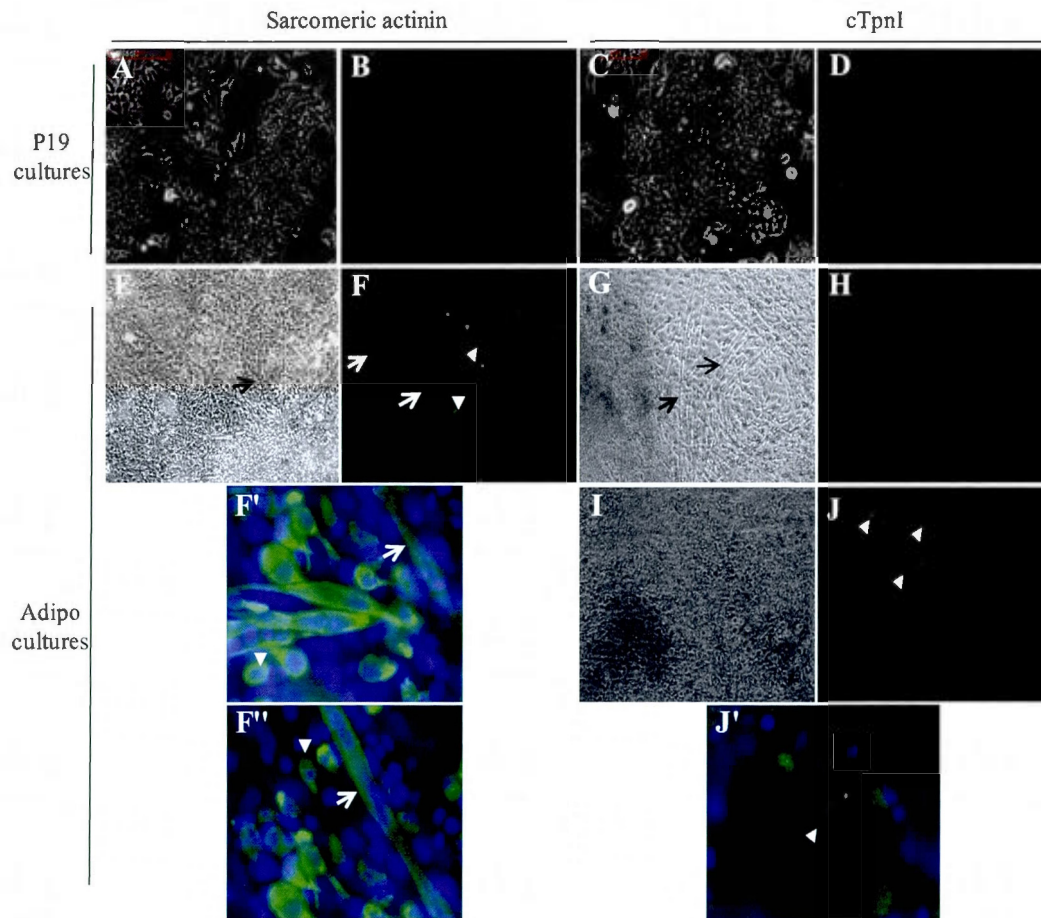


Figure 7.3 Adipogenic conditions generate skeletal and cardiac myocytes. Immunocytofluorescence (green) of sarcomeric actinin (B,F,F',F'') and cTpnI (D,H,J,J') in undifferentiated P19 cells and in D7+20 Adipo cultures. Corresponding phase contrast micrographs are shown on the left side (A,E,C,G,I). Magnification was 100X, except 630X for F', F'' and J' (where DAPI counterstaining is shown in blue). Arrows point to fibers, and arrowheads to fluorescent rounded cells. The (G,H) pair shows a field enriched with fibers, (I,J) a field containing rounded cells but not fibers, and (E,F) a field containing both structures. Notice the absence of cTpnI fluorescence in H, the multinucleated fibers in F' and F'', and the cytoplasmic localization of cTpnI in J'. Une version électronique est fournie (CD).

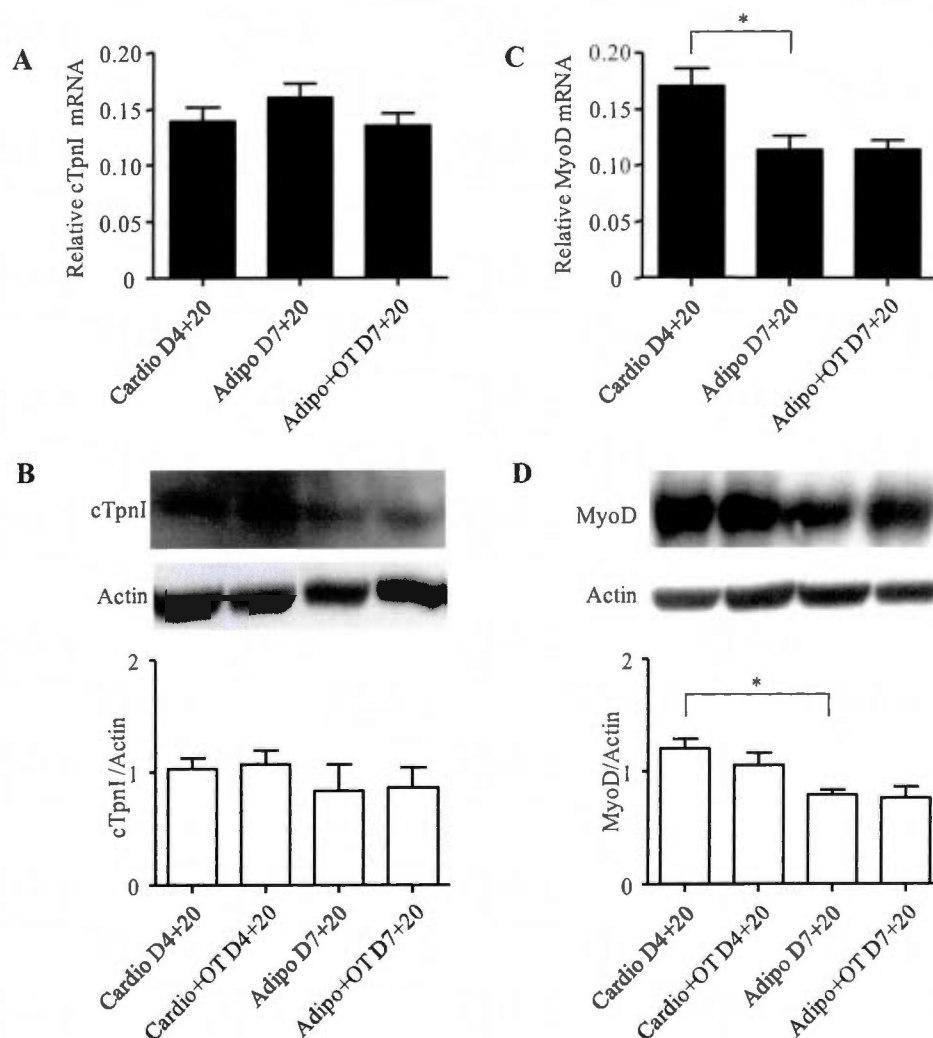


Figure 7.4 Myogenesis in adipogenic and OT-based cardiomyogenic protocols. Cells subjected to the Adipo or Cardio protocols were analysed for cTpnI (A,B) and MyoD (C,D) expression. In some studies, OT was provided during the entire (20 days) post-aggregation period (Adipo+OT and Cardio+OT). (A,C) qPCR results expressed as means \pm SEM for three independent studies. cTpnI and MyoD were standardized to actin mRNA. (B,D) Immunoblot specimens, and densitograms (means \pm SEM) obtained from three independent cell series. cTpnI and MyoD immunosignals are expressed relatively to actin. The symbol * indicates significant difference ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

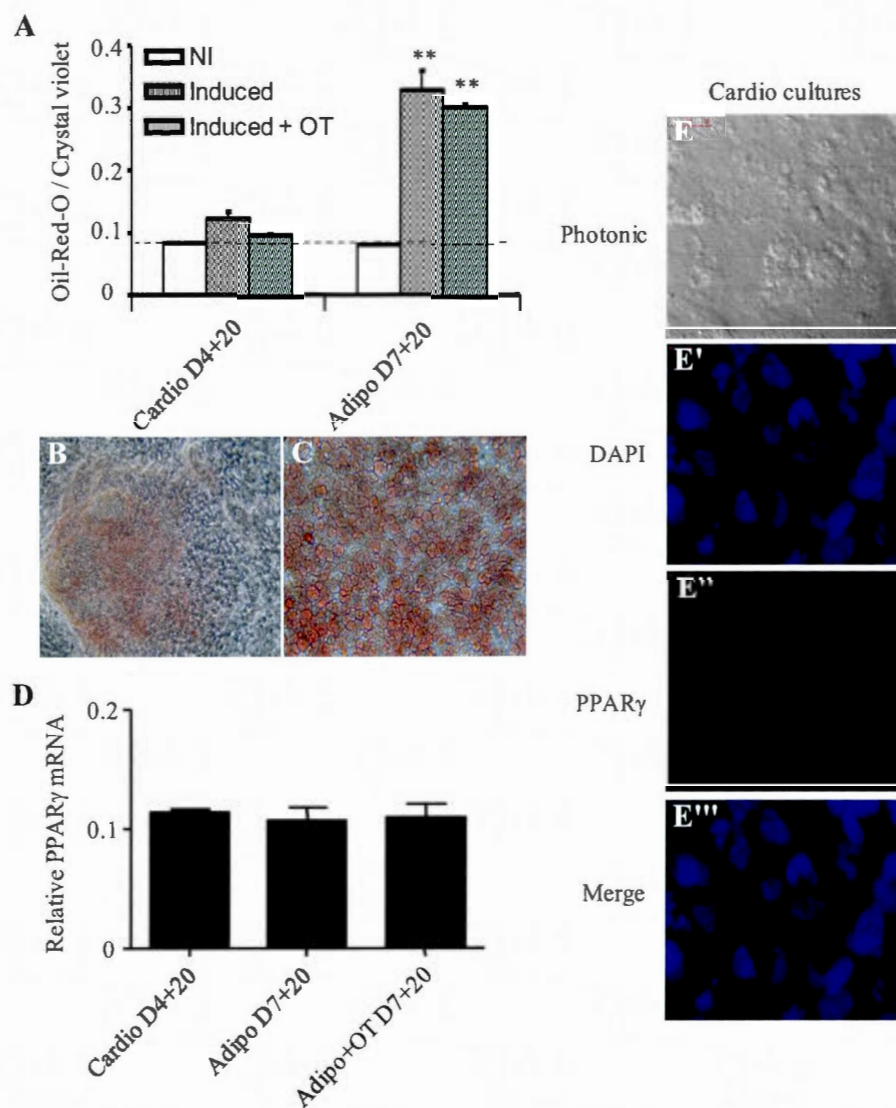


Figure 7.5 Adipogenesis in adipogenic and OT-based cardiomyogenic protocols. Cells subjected to the Adipo or Cardio protocols were analysed for Oil-Red-O staining and PPAR γ expression. Adipo+OT and Cardio+OT indicate that OT was provided over the post-aggregation period. (A) Oil-Red-O signal standardized by Crystal violet staining. Results (means \pm SEM) are from three independent cell series. The symbols ** indicate highly significant differences ($p < 0.01$) with corresponding NI cultures. The dashed line separates unspecific and triglyceride specific Oil-Red-O staining. Phase contrast micrographs of Oil-Red-O stained Cardio cultures (B) and Adipo cultures (C) respectively illustrating unspecific (between cells) and triglyceride specific (inside cells) retention of the dye. (D) PPAR γ qPCR results expressed as means \pm SEM for three independent studies. GAPDH was used for standardization. (E-E''') Photonic (DIC optics) and fluorescent micrographs (630X) of Cardio cultures immunoprobed for PPAR γ and counterstained with DAPI. Une version électronique est fournie (CD).

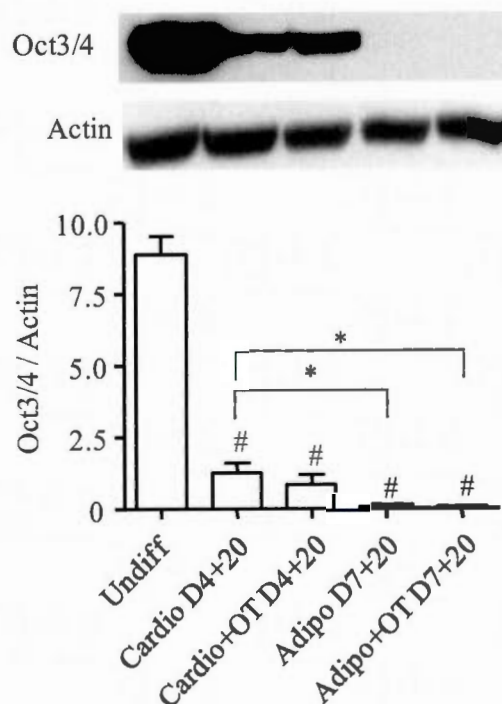


Figure 7.6 Downregulation of Oct3/4 pluripotency marker in adipogenic and OT-based cardiomyogenic protocols. Undifferentiated (Undiff) cells and cells subjected to the Adipo or Cardio protocols were analysed for Oct3/4 expression. Cardio+OT and Adipo+OT indicate that OT was provided over the post-aggregation period. An immunoblot specimen, and densitograms (means \pm SEM) obtained from three independent cell series. Oct3/4 immunosignal is expressed relatively to actin. The symbols # and * respectively indicate significant differences with Undiff, and between Cardio and Adipo protocols ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

7.9 Supplemental materials

Figure 7.1S Video of contracting fibers. A field (200X) containing contracting fibers in a D7+20 Adipo culture. Une version électronique est fournie (CD).

Figure 7.2S Video of beating rounded cells. A field (200X) containing beating rounded cells in a D7+20 Adipo culture. Une version électronique est fournie (CD).

**CHAPITRE VIII : THE RETINOID AGONISTS TTNPB AND LG100268
DIFFERENTLY MODULATE ADIPOGENESIS, MYOGENESIS AND THE
PHOSPHORYLATION OF ERK AND P38 MAPK IN P19 STEM CELLS**

Le travail de ce chapitre fut soumis dans *Stem Cells and Development*, par Frédéric Bouchard et Joanne Paquin. Certaines parties des résultats ont été présentées sous forme de communications dans des congrès:

- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, Le TTNPB, un agoniste des récepteurs de l'acide rétinoïque, est pro-adipogénique et anti-myogénique dans les cellules souches P19. 2^e Colloque annuel du Centre Pharmaquam de l'UQAM. Montréal. 11 juin 2010.
- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, Le TTNPB, un agoniste des récepteurs de l'acide rétinoïque, est pro-adipogénique et anti-myogénique dans les cellules souches P19. 6^e Colloque annuel du Centre de recherches biomédicales de l'UQAM (BioMed). Montréal 28-29 avril 2010.

8.1 Résumé

L'acide *tout-trans* rétinolique (atRA), un régulateur essentiel de la prolifération et de la différenciation cellulaires, agit principalement en se liant aux récepteurs de l'acide rétinolique (RAR) et aux récepteurs de rétinoïdes-X (RXR) dans le noyau. Les cellules de carcinome embryonnaire P19 se différencient lorsqu'exposées à l'atRA. Une exposition précoce génère des neurones alors qu'une exposition tardive produit des dérivés mésodermiques (adipocytes, cardiomyocytes et cellules de muscle squelettique). En considérant les études qui rapportent une implication des MAPK ERK et P38 dans la différenciation cellulaire, nous avons postulé que des ligands sélectifs des RAR ou des RXR peuvent différemment influencer le devenir mésodermale des cellules P19 de même que la phosphorylation d'ERK et de P38. La présente étude compare la réponse cellulaire à l'atRA, au TTNPB, un pan-agoniste des RAR, et au LG100268, un pan-agoniste des RXR, tous utilisés à 10^{-6} M. Les trois rétinoïdes diminuent la prolifération cellulaire et l'expression du marqueur de pluripotence Oct3/4. Le LG100268 a une efficacité adipogénique et myogénique similaire à celle de l'atRA. Par contre, le TTNPB change complètement la balance en faveur de l'adipogenèse. L'atRA et le LG100268 diminuent la phosphorylation d'ERK et augmentent celle de P38 de façon semblable. Le TTNPB est plus efficace à inactiver ERK mais moins efficace à activer P38. Un inhibiteur de ERK ou de P38 a été ajouté en même temps que l'atRA pour tenter de reproduire l'action du TTNPB. Les deux associations se sont révélées adipogéniques et l'inhibiteur de P38 a même stimulé l'adipogenèse induite par l'atRA. L'un comme l'autre inhibiteur de ERK ou de P38 a stimulé la myogenèse induite par l'atRA. L'activation de la voie des RXR est permissive à l'adipogenèse et requise pour la myogenèse alors que la voie des RAR est pro-adipogénique et anti-myogénique. L'action des rétinoïdes est accompagnée par des effets distincts sur ERK et P38. Les effets sur la dynamique de phosphorylation pourraient guider la sélection de morphogènes rétinoïdes.

Manuscript

**The retinoid agonists TTNPB and LG100268 differently modulate
adipogenesis, myogenesis and the phosphorylation of Erk and P38
MAPK in P19 stem cells**

Frédéric Bouchard, Joanne Paquin*

Département de chimie-biochimie and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8

Running title: Retinoids, MAPK and mesodermal differentiation

*Corresponding author: J. Paquin (paquin.joanne@uqam.ca), Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8. Phone: (1) 514-987-3000 (ext. 4990). Fax: (1) 514-987-4054.

Abbreviations: atRA, *all-trans*-retinoic acid; CM, cardiomyocytes; cTpnI, cardiac troponin inhibitor; DMSO, dimethylsulfoxide; EC (cells), embryonic carcinoma (cells); ES (cells), embryonic stem (cells); GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; HRP, horseradish peroxidase; LPL, lipoprotein lipase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; α MEM, alpha-modified Eagle's minimal essential medium; MLC2v, myosin light chain-2v; NI, non-induced; PBS, phosphate buffer saline; Oct3/4, octamer-binding transcription factor 4; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RAR, retinoid acid receptor; RT, reverse transcription; RXR, retinoid-X receptor; SDS, sodium dodecylsulfate; SKM, skeletal muscle cells; TBS, tris buffer saline; TTNPB, (*E*)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl] benzoic acid; T3, triiodothyronine.

8.2 Abstract

All-trans-retinoic acid (atRA), an essential regulator of cell proliferation and differentiation, acts mainly through binding to the nuclear retinoic acid receptors (RAR) and retinoid-X receptors (RXR). The P19 embryonic-like stem cells undergo differentiation when exposed to atRA. Early exposure generates neurons whereas late exposure produces mesodermal derivatives (adipocytes, cardiomyocytes, skeletal muscle cells). Considering the reported implication of ERK and P38 mitogen-activated protein kinases in cell differentiation, we postulated that RAR- and RXR-selective ligands can differently influence the mesodermal fate of P19 cells as well as ERK and P38 phosphorylation. This study compared the cell response to atRA, the pan-RAR agonist TTNPB and the pan-RXR agonist LG100268, all used at 10^{-6} M. Expression of markers distinguished cell types. The three retinoids diminished cell proliferation and expression of Oct3/4 stemness marker. LG100268 had similar adipogenic and myogenic efficiency as atRA but TTNBP completely switched the balance towards adipogenesis. AtRA and LG268 similarly decreased ERK phosphorylation and increased P38 phosphorylation. TTNPB was more efficient in ERK dephosphorylation and less efficient in P38 phosphorylation. AtRA was associated with either ERK or P38 inhibitor to try reproduce the TTNPB action. Both associations were adipogenic and P38 inhibitor even stimulated the atRA adipogenic action. Either ERK or P38 inhibitor increased the atRA-induced myogenesis. Activation of RXR pathways is thus permissive to adipogenesis and required for myogenesis while activation of RAR pathways is pro-adipogenic and anti-myogenic. These retinoid actions are accompanied by distinct effects on ERK and P38. Effects on phosphorylation dynamics could guide the selection of retinoid morphogens.

Keywords: Retinoic acid, Retinoids, Myogenesis, Adipogenesis, MAPK

8.3 Introduction

All-trans-retinoic acid (atRA), a critical regulator of cell proliferation, apoptosis and differentiation, is required for the appropriate development of the vertebrate organism (Ross *et al.*, 2000 ; Zile *et al.*, 2004). It binds to the nuclear retinoic acid receptors (RAR) and

retinoid-X receptors (RXR), each receptor group comprising α , β , and γ isoforms (Ross et al., 2000). Dimers such as RXR/RXR and RXR/RAR are the functional DNA binding units that control gene expression (Kastner et al., 1997a). The 9-*cis*-RA has served as a reference retinoid to compare RAR and RXR binding properties. *In vitro*, RAR can bind both atRA and 9-*cis*-RA whereas RXR bind only 9-*cis*-RA (Chambon, 1996). *In vivo*, isomerisations can occur (Sucov et Evans, 1995), contributing to the physiological complexity of the retinoid actions. AtRA influences, in concentration- and time-dependent manners, the differentiation of embryonic stem (ES) cells and embryonic carcinoma (EC) cells (Wobus, 2001). For example, in mouse P19 EC cells, a model of ES cells, high atRA concentrations (10^{-6} M) stimulate neurogenesis when provided at time zero of the formation of embryoid bodies (Rudnicki et McBurney, 1987) but induce mesodermal differentiation when added two days later (Bouchard et Paquin, 2009). In fact, adipocytes as well as cardiomyocytes (CM) and skeletal muscle cells (SKM) are generated altogether in this case.

Synthetic RAR and RXR ligands are largely evaluated as possible therapeutic anticancer drugs capable of controlling cell proliferation (Altucci et al., 2007 ; Brtko, 2007). In comparison, the use of such ligands to direct stem cell differentiation has been much less exploited. One study reported enhanced cardiomyogenesis in ES cell cultures treated with a RXR agonist (Honda et al., 2005). Another study pharmacologically showed the involvement of RAR β in adipogenesis (Monteiro et al., 2009).

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) have a role in stem cell differentiation. A small number of studies have investigated the implication of ERK and P38 MAPK in mesodermal differentiation. P38 activity is involved in the spontaneous differentiation of mouse ES cells into CM or SKM (Aouadi et al., 2006b ; Barruet et al., 2011 ; Wu et al., 2010) or the dimethylsulfoxide (DMSO)-induced cardiomyogenic differentiation of P19 cells (Davidson et Morange, 2000 ; Enarsson et al., 2002). A possible implication of P38 in the maturation of pre-adipocytes to adipocytes has been reported (Aouadi et al., 2007 ; Aouadi et al., 2006c), but a role in adipogenic commitment is not clear. On the other hand, whereas ERK activity is necessary for adipogenic determination (Binetruy et al., 2007 ; Bost et al.,

2005a ; Bost *et al.*, 2005b ; Bost *et al.*, 2002), its role in sarcomeric myogenesis is not completely clear. ERK was either found unnecessary (Bost *et al.*, 2002) or necessary in the determination towards the CM lineage (Eriksson *et Leppa*, 2002 ; Graichen *et al.*, 2008 ; Molina *et al.*, 2009). AtRA has been shown to influence MAPK activity in diverse circumstances but the impact of other retinoids on these kinases has rarely been evaluated.

We postulated that the modulation of RAR and RXR signalings can help to direct mesodermal cell differentiation to either an adipogenic or a myogenic pathway with possibly a differential action on ERK and P38. We thus compared the action of RAR-specific and RXR-specific retinoid ligands (Fig. 8.1). TTNPB (that is *E*-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl-1-propenyl) benzoic acid) and LG100815 (LG815) are respectively agonist and antagonist of all RAR isoforms (Mou *et al.*, 2004 ; Pignatello, Kauffman *et Levin*, 1997). LG100268 (LG268) and LG101208 (LG208) are respectively RXR-specific pan-agonist and pan-antagonist (Mou *et al.*, 2004). The CL6-MLC2v-GFP clone of the mouse P19 cell line was used in this work. This clone, named P19-MLC2v-GFP throughout, carries the green fluorescent protein (GFP) gene under the transcriptional control of the myosin light chain-2v (MLC2v) promoter that is characterized by its cardiac ventricle-specific expression (Moore *et al.*, 2004). Apparition of the GFP fluorescence in the differentiating cultures reports the generation of CM. The other cell phenotype markers used were : cardiac troponin inhibitor (cTpnI) (for CM); sarcomeric α -actinin (for CM and SKM); triglyceride droplets, peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and lipoprotein lipase (LPL) (for adipocytes).

8.4 Materials and Methods

8.4.1 Culture and differentiation of P19-MLC2v-GFP cells

Cells were routinely cultured at 37°C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂, and in a propagation medium consisting of alpha-modified Eagle's minimum essential medium (α MEM; Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada), 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin (HyClone Laboratories, South Logan, Utah, USA) (Bouchard *et Paquin*, 2009 ;

Paquin *et al.*, 2002). Passages were done every two days using trypsin and EDTA. The cells were kept under G418 selection (400 $\mu\text{g/mL}$; HyClone Laboratories) until application of the differentiation protocol. The mesodermal differentiation protocol was as described (Bouchard et Paquin, 2009). Briefly, P19-MLC2v-GFP cells were grown, from day zero (D0) to D2, in hanging drops of 1000 cells in 20 μL of propagation medium to initiate aggregation. The aggregates (embryoid bodies) were transferred into bacteriological grade-plates and cultured in suspension for three days, in propagation medium supplemented with 10^{-6} M atRA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). This medium was renewed every day (from D2 to D5). Aggregates were maintained in suspension for another two days in absence of atRA (D5 to D7), and then as adherent cultures for up to 20 days following transfer to tissue culture grade-plates (D7+20). The adherent cultures were grown in maturation medium consisting of propagation medium supplemented with 85 nM insulin and 2 nM triiodothyronine (T3) (Sigma-Aldrich). This medium was renewed every second day. To study retinoid-specific effects, TTNPB (10^{-6} M; Sigma-Aldrich) or LG268 (10^{-6} M; a generous gift from Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA) was used in the place of atRA. In some studies, the ERK inhibitor PD98059 (10 μM) or the P38 inhibitor SB20350 (10 μM) (Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada) was combined with atRA. Non-induced (NI) cultures were subjected to the aggregation and post-aggregation procedures but in absence of inducing agents.

8.4.2 Cell proliferation assay with Crystal violet

P19-MLC2v-GFP cells were seeded in 96 well-plates and grown, for 48 h, in propagation medium supplemented with 10^{-6} M of the agonist or antagonist retinoid. The LG815 and LG208 antagonists were a gift from Ligand Pharmaceuticals. Cells were fixed for 20 min in phosphate buffer saline (PBS) containing 4% *para*-formaldehyde, rinsed in PBS and covered for 30 min with 0.1% Crystal Violet (Sigma-Aldrich). Dye retained by cells was extracted with 10% acetic acid and measured by absorbance at 595 nm (Bouchard et Paquin, 2009 ; Laplante, Beliveau et Paquin, 2004).

8.4.3 Polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Invitrogen), UV-quantified and diluted in diethylpyrocarbonate treated-water to a concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Any DNA in the extracts was digested by incubation with recombinant DNase 1 (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) for 15 min at 37°C. Integrity of total RNA and absence of DNA contamination in extracts were verified by electrophoresis in 1% agarose gels. Reverse transcription (RT) was done using an Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and oligo-dT (Amersham Biosciences, Oakville, ON, Canada). Reactions ran 1 h at 37°C followed by 5 min inactivation at 95°C. Quantitative real-time PCR (qPCR) amplifications were done with a LightCycler instrument (Roche Diagnostics) using a QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen), the cDNA and 0.5 μM of combined forward and reverse specific primers (Invitrogen). Primer sequences and qPCR conditions are detailed in Table 8.1. Fifty cycles enabled development of the exponential amplification phase and quantification was then performed using the RelQuant software (Roche Diagnostics). Size and purity of the qPCR products were verified on agarose gels. Absence of DNA contamination was verified by amplifying total RNA samples not subjected to reverse transcription.

8.4.4 Cytofluorescence

Cells grown in wells of 12 well-tissue culture plates were fixed for 20 min in PBS containing 4% *para*-formaldehyde, rinsed in PBS and stored at 4°C in this buffer until analysis. Cells were permeabilized for 10 min in PBS containing 1% Triton X-100, blocked for 60 min in PBS containing 1.5% horse serum, and successively incubated, for 60 min each time, with mouse anti-sarcomeric (skeletal and cardiac) α -actinin antibody (clone EA-53; Sigma-Aldrich) and rhodamine-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Cell washes and antibody dilutions (1/50) were done with PBS containing 1.5% horse serum. Cell micrographs (for the analysis of immunofluorescently-marked sarcomeric actinin and of transgenic GFP) were taken with a Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc camera mounted on a Nikon Eclipse Ti

microscope equipped for epifluorescence. The fluorescence signals were analyzed with Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) using the threshold function.

8.4.5 Oil-Red-O staining

Cell cultures were fixed for 20 min in PBS containing 4% para-formaldehyde, rinsed in PBS, covered for 3 min with 100% propylene glycol and then for 60 min with Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) diluted to 0.5% w/v in 60% isopropanol, rinsed for 1 min with 60% propylene glycol and dried at 37°C for 60 min. Dye retained by cells was extracted with isopropanol and measured by absorbance at 510 nm. Cultures were then counterstained with Crystal Violet (see Cell proliferation assay above) to correct Oil-Red-O values for variations in cell culture densities. Evaluation of Oil-Red-O staining was also done on micrographs (Ducharme et al., 2010). In this case, after incubation with Oil-Red-O, the cultures were covered with PBS and photographed with a Scion 12-bit Color FireWire 1394 Camera (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) mounted on a Nikon Eclipse Ti microscope. A transparent grid comprising 480 squares was placed on the micrographs to count the squares containing stained cells. The results are expressed as percentages of the total number of squares (% surface occupancy). At least three fields were photographed for each dish and averaged to represent the dish status. Fields of similar cell densities were chosen for all dishes of a cell series.

8.4.6 Gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were washed with PBS, lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)) containing protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich) and the phosphatase inhibitors sodium orthovanadate (1mM) and sodium fluoride (1mM). Cells were stored at -20°C until analysis. Protein concentration was estimated with a Micro BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Protein aliquots (40 µg) were loaded onto 10% polyacrylamide-SDS gels, electrophoresed for 60 min at 150 V using a MiniProtein TetraCell system (BioRad, Hercules, CA, USA), and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for 30

min, at 100 V, using a Criterion Blotter apparatus (Biorad). Membranes were blocked 60 min in Tris buffer saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 and 3% bovine serum albumin, and successively probed (60 min each time) with primary antibody (dilution 1/1000) and horseradish (HRP)-conjugated secondary antibody (dilution 1/10000). Antibody incubations and membrane washes were done in TBS containing 0.1% Tween-20. Immune complexes were revealed by incubation of membranes with ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, ON, Canada) and exposition to HyBlot CLTM films (Denville Scientific, Toronto, ON, Canada). Films were analysed by densitometry using Image J software (National Institutes of Health). Rabbit anti-Oct3/4 (H-134) and goat anti-cTpnI (D-12) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-ERK1/2, anti-phospho-ERK1/2, anti-P38 and anti-phospho-P38 were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Membranes were reprobed with mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) or rabbit anti- α/β -tubulin antibody (Cell Signaling Technology) for normalization. Secondary antibodies, conjugated to HRP, were from Jackson ImmunoResearch Laboratories or Biosource International (Camarillo, CA, USA).

8.4.7 Statistics

The JMP IN 8.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for statistical analysis. Means between cell populations were compared using Tukey-Kramer or test of the means (significance level $p < 0.05$). Results were obtained from three independent cell series.

8.5 Results

8.5.1 Effect of retinoid ligands on cell proliferation and stemness

The capacity of a substance to act as an inducer of stem cell differentiation is often associated with its capacity to reduce cell proliferation and induce loss of the cell stemness character. AtRA and analogs used in this work were compared by these two criteria. They were all used at 10^{-6} M throughout since this concentration of atRA is effective in inducing adipogenesis and myogenesis in the P19 cell model and atRA and analogs have similar K_d values, in the 10 nM range, for their respective retinoid receptors [atRA and TTNPB: (Boehm

et al., 1994 ; Crettaz *et al.*, 1990 ; Vuligonda, Lin et Chandraratna, 1996); LG268: (Boehm *et al.*, 1995); LG815 and LG208: personal communication from Pharmaceutical Ligands]. Similar K_d values of 10 nM characterize the binding of 9-cis-RA to RXR (Vuligonda, Lin et Chandraratna, 1996). Cell proliferation was evaluated after culturing adherent monolayers of P19-MLC2v-GFP cells in the presence of each retinoid (Fig. 8.2A). AtRA decreased the proliferation of these cells by 70% compared to NI cells. The two retinoid agonists, LG268 and TTNPB, had also a similar anti-proliferative action, reducing cell density by 50% and 70%, respectively. In contrast, the RXR and RAR antagonists, respectively LG208 and LG815, had no influence on the proliferation of P19 cells. LG208 (10 μ M) had also no effect on the proliferation of breast carcinoma MCF-7 cells (Chen *et al.*, 2006). The stemness character was evaluated through the protein expression of Oct 3/4 transcription factor (Palmieri *et al.*, 1994 ; Scholer *et al.*, 1989). Oct3/4 expression was measured in D0, D2 and non-induced (NI) D3 cell aggregates to analyse the effect of aggregation on this marker. Oct3/4 level diminished with time during aggregation, reaching 50% of the initial value after 3 days (Fig. 8.2B). A 24h-exposure (D2 to D3) to either atRA, LG268 or TTNPB importantly decreased Oct3/4 expression compared to NI (respectively, by 89%, 77% and 71%). The decreasing effect of LG268 and TTNPB was more pronounced in the presence of atRA. Similar to their lack of effect on cell proliferation, the retinoid antagonists LG208 and LG815 had no significant effect on Oct3/4 level, compared to NI treatment. AtRA still preserved its reducing effect on Oct3/4 in the presence of antagonists. Considering their lack of effect on cell proliferation and stemness, the antagonists appeared as poor candidate inducers of cell differentiation and were not used further in this study. The work focused on the agonists.

8.5.2 TTNPB is more potent than atRA in inducing adipogenesis

We and others have shown that atRA can induce ES and EC cells to differentiate into adipocytes (Bouchard et Paquin, 2009 ; Dani *et al.*, 1997). The induction of P19-MLC2v-GFP cells with LG268 or TTNPB as the atRA substitute generated cells containing lipid droplets stained by the Oil-Red-O triglyceride dye (Figs 8.3B-D). These fat cells were not found in corresponding NI cultures (Fig. 8.3A) and in undifferentiated cultures (D0, not shown). Quantification of staining showed that, of the three retinoids tested, TTNPB was the

most potent inducer of triglyceride production in cultures (Figs 8.3E, F). Gene expression of the transcription factor PPAR γ and of the lipolytic enzyme LPL, another established adipocyte marker (Hillel et al., 2009), was higher in induced than in NI cultures by qPCR analysis (Fig. 8.3G). Like the triglyceride measurements, the gene expression data underlined the important adipogenic action of TTNPB.

8.5.3 LG268 but not TTNPB induces myogenesis

We previously showed that skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 cells treated with atRA (Bouchard et Paquin, 2009). The myocytes appear as soon as 10 days post-aggregation (D7+10) (Bouchard et Paquin, 2009). In this work, we determined whether replacing atRA by the synthetic RAR and RXR selective agonists had an impact on myogenesis. As expected, atRA treatment generated SKM, identified by the red fluorescence of sarcomeric α -actinin immunostaining, the bipolar shape and the absence of the cardiac-driven GFP green fluorescence (Fig. 8.4B). Cultures induced with LG268 also contained these α -actinin^{POS}-GFP^{NEG} cells (Fig. 8.4D). CM were also generated in atRA- as well as in LG268-induced cultures as indicated by the presence of rounded cells exhibiting brilliant GFP-borne green fluorescence on MLC2v micrographs and green (GFP^{POS}) or yellowish (GFP^{POS} and sarcomeric α -actinin^{POS}) fluorescence on merged micrographs (Figs 8.4B, D). No brilliant green or red fluorescence was seen in NI cultures (Fig. 8.4A). Interestingly, TTNPB-treated cultures resembled NI cultures (Fig. 8.4C). The compilation of fluorescence micrographs obtained from independent cell culture series showed similar myogenic action of atRA and LG268, and underlined the anti-myogenic action of TTNPB (Fig. 8.4E). Like cytofluorescence analysis, Western blotting of sarcomeric α -actinin and cTpnI indicated lower expression of these myomarkers in TTNPB- than in atRA- and LG268-treated cultures (Fig. 8.4F). Considering that cTpnI is a general marker of CM (Ausoni *et al.*, 1994 ; Gorza *et al.*, 1993), the blotting results show a tendency of LG268 to generate a higher proportion of myocytes of the cardiac type compare to atRA. There are two apparent discrepancies between cytofluorescence and immunoblotting results. First, there was basal expression of the myogenic markers in TTNPB cultures by immunoblotting despite the absence of cytofluorescence signals (Figs 8.4C, E). This could be a remnant of the undifferentiated

precursors. Indeed, markers of various mature cell phenotypes can be observed altogether, at basal levels, in multipotent cell progenitors, with the specialized markers increasing and the other ones gradually disappearing during cell type specification (Dupin, Calloni et Le Douarin, 2010). Second, while cytofluorescence showed strong differences in myomarker expression between TTNPB cultures and cultures induced with atRA or LG268, the differences were modest by immunoblotting. This can be explained by the small number of muscle cells in the cultures compared to the cells expressing basal marker levels. In fact, whereas the muscle cells exhibited strongly increased cytofluorescence compared to other cells in the cultures, they contributed only modestly to the overall signal intensities by Western blotting.

8.5.4 Time course of ERK and P38 phosphorylation in atRA and retinoid treated cultures

There have been some studies done on the activity of ERK and P38 in ES cells subjected to the mesodermal protocol (Bost *et al.*, 2002 ; Davidson et Morange, 2000 ; Eriksson et Leppa, 2002). However, the impact of retinoids on these MAPK, particularly TTNPB and LG268, has not yet been addressed. A transient increase in ERK phosphorylation was observed at the beginning of embryoid body formation (D0-D2) in all cultures (Figs 8.5A-D). This was followed, in NI cultures, by a decrease to below basal levels until D6 and the return to initial values and above until D9, the last day analysed. Introduction of an inducer at D2 had an impact. RA induced a greater reduction in ERK phosphorylation in the D3 to D6 period compared to NI (Figs 8.5A, B). The effect of LG268 on ERK resembled that of atRA (Fig. 8.5C) whereas TTNPB was more potent (Fig. 8.5D). Like for ERK, P38 phosphorylation increased from D0 to D2 with the start of embryoid body formation (Figs 8.5E-H). Thereafter, in NI cultures, P38 phosphorylation almost plateaued until D6 instead of decreasing like ERK phosphorylation (Fig. 8.5F). RA and LG268 similarly increased P38 phosphorylation over NI levels starting at D4 (Figs 8.5F, G) whereas the P38 phosphorylation level in TTNPB-induced cultures matched that of NI cultures (Fig. 8.5H). Overall, atRA and LG268 had similar effects on ERK and P38 phosphorylation whereas TTNPB showed differences.

8.5.5 Effect of the combination of atRA and MAPK inhibitors on mesodermal differentiation

Considering that the increased adipogenic action of TTNPB compare to atRA went along with greater ERK dephosphorylation and lower P38 phosphorylation, we reasoned that combining atRA with the ERK inhibitor PD98059 or with the P38 inhibitor SB203580 could increase atRA adipogenic action and perhaps interfere with its myogenic action. PD98059 did not increase the atRA-induced adipogenesis but it did not inhibit it neither (Figs 8.6A-E). SB203580 stimulated, by about 2-fold, the adipogenic action of atRA and this effect was observed as soon as D7+14. As shown in Figs 8.6F-J, the α -actinin cytofluorescence data indicate that the ERK inhibitor as well as the P38 inhibitor doubled the myogenic action of atRA. According to the MLC-2v-GFP fluorescence, the ERK inhibitor even appeared to stimulate the cardiomyogenic action of atRA compare to the P38 inhibitor.

8.6 Discussion

P19 embryonic stem cells can differentiate into various cell types in response to atRA. In particular, they give rise to adipocytes and to myocytes of the cardiac and skeletal types, present altogether in the same culture, upon exposure to atRA from D2 to D5 of embryoid body formation (Bouchard et Paquin, 2009). These cells thus provide a useful model to investigate the impact of modulating atRA signaling to direct cell differentiation decisions in pluripotent stem cells with possible applications in the field of cell based-therapies. This work shows that atRA analogs can influence the balance of the mesodermal phenotypes depending upon their specificity towards RAR and RXR. In addition, these analogs, like atRA, have an effect on the activation of ERK and P38, two MAPK reported to be implicated in stem cell differentiation. Beside their capacities to bind to and transactivate nuclear RAR/RXR, retinoids could also be selected on the basis of their impact on MAPK phosphorylation/activation dynamics.

Using isoform-specific pharmacological agonists, one study showed the importance of RAR β in the differentiation of ES cells into adipocytes (Monteiro et al., 2009). In the present

work, results of the use of atRA and TTNPB in the mesodermal protocol confirm the adipogenic influence of the activation of RAR pathways. For the first time, however, is revealed the concomitant anti-myogenic action of a RAR-specific agonist. Since the affinity of TTNPB for RAR resemble that of atRA, the higher adipogenic potential of TTNPB compare to atRA could be due to prolonged nuclear receptor activation as a consequence of higher disponibility through reduced affinity for cytosolic RA binding proteins (CRABP) or of increased resistance to metabolism (Eichele, Tickle et Alberts, 1985 ; Pignatello, Kauffman et Levin, 1997 ; Pignatello, Kauffman et Levin, 2002). The adipogenic action of RAR agonists however appears to depend on the developmental state of the adipocyte precursors. Indeed, while atRA and synthetic RAR agonists stimulate the induction of adipogenesis in undifferentiated cells (Monteiro *et al.*, 2009 and this work), they inhibited the terminal differentiation of mouse 3T3-L1 pre-adipocytes (Xue et al., 1996) as well as of porcine primary pre-adipocytes (Brandebourg et Hu, 2005). In the latter case, PPAR γ and RXR α mRNAs were downregulated. In contrast, the activation of RXR pathways is permissive to adipogenesis both during induction of differentiation (in this work, LG268 promoted adipogenesis in P19 cell cultures) as well as during maturation (LG268 and methoprene acid, another pan-RXR agonist, stimulated the terminal differentiation of pre-adipocytes (Brandebourg et Hu, 2005 ; Wang *et al.*, 2000). This raises the possibility of controlling cell differentiation through the start and duration of retinoid treatment.

Interestingly, in contrast to TTNPB, atRA, the physiological RAR agonist, acted similarly to LG268 by being permissive to both adipogenesis and myogenesis. The myogenic effect of atRA compare to TTNPB could be the consequence of activation of RXR pathways in addition to RAR pathways through perhaps atRA isomerisation or RAR/RXR dimerization. In line with this, PA024, a RXR agonist, was reported to enhance the spontaneous cardiomyogenic differentiation of ES cells (Honda et al., 2005) and, contemporaneously to our work, bexarotene, another RXR agonist, was shown to stimulate skeletomyogenesis, also in ES cells (Le May *et al.*, 2011). Likewise, this study reveals the cardiomyogenic and skeletomyogenic actions of another RXR agonist, LG268. Compare to atRA, LG268 showed a tendency to favor CM. We did exploratory studies of combining atRA with the RAR antagonist LG815 to test whether this treatment could favor myocytes over adipocytes. There

was no difference in the relative yields of these phenotypes between atRA and atRA+LG815 treatments (unpublished). This avenue of concomitant activation of one pathway and inactivation of the other could however give different results with other selections of retinoids.

A small number of studies have shown the implication of ERK and P38 in mesodermal differentiation, fewer analysed the effect of atRA on these kinases in this process and, as far as we are aware, none analysed the effect of atRA analogs on MAPK in stem cells. This work shows that analogs having different impact on mesodermal differentiation had also different effects on ERK and P38. Inhibition of P38 activity during the generation of embryoid bodies was reported to inhibit the spontaneous differentiation of mouse ES cells into CM and SKM (Aouadi *et al.*, 2006b ; Barruet *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2010) or the cardiomyogenic differentiation of P19 cells induced with DMSO (Davidson et Morange, 2000 ; Enarsson *et al.*, 2002). In this work, the fact that TTNBP, contrarily to atRA and LG268, did not stimulate P38 phosphorylation above levels seen in NI cultures would be in line with its anti-myogenic effect compare to the two other retinoids. On the other hand, we observed that the addition of P38 inhibitor to the myogenic atRA did not inhibit myogenesis, rather there was marked stimulation. There could be at least two explanations for the apparent contradiction. First, the myogenic differentiation of ES cells was reported to be finely tuned by the inhibitor concentration: SB203580 concentrations below 10 μ M stimulated whereas concentrations above inhibited this differentiation (Graichen *et al.*, 2008 ; Kempf *et al.*, 2011). The threshold value was stimulatory in P19 cells. Second, the presence of atRA inducer distinguishes our protocol from the other ones above. Evidences accumulate indicating that, in addition to its classical genomic activities, atRA has non-genomic actions (Alsayed *et al.*, 2001 ; Bruck *et al.*, 2009). AtRA can rapidly activate P38 or the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-ERK pathway with downstream consequences on assemblages of transcription complexes (Bruck *et al.*, 2009 ; Masia *et al.*, 2007). It is not known whether these activations could happen together in the same cell but each would involve the presence of RAR pools in the cytosol or in lipid rafts at the plasma membrane and the incorporation of these RAR into signaling complexes (Masia *et al.*, 2007 ; Piskunov et Rochette-Egly, 2011). Whether there exists such a mechanism of P38 activation in ES and P19 cells is not known but, if so, it would likely be

affected by the presence or not of extracellular atRA. In this study, TTNPB, which was more adipogenic than atRA, did not increase P38 phosphorylation in contrast to atRA. Interestingly, the combination of atRA with P38 inhibitor greatly stimulated adipogenesis, pointing to P38 as being a negative regulator of adipogenic commitment. Negative regulation by P38 was also observed in the maturation of pre-adipocytes (Aouadi *et al.*, 2007 ; Aouadi *et al.*, 2006c).

In contrast to the P38 results, our ERK results do not match as well with those of other studies. First, atRA decreased ERK phosphorylation when added at D2 of P19 cell aggregation whereas stimulation of ERK phosphorylation by atRA was reported by others (Bost *et al.*, 2002 ; Reffas et Schlegel, 2000). The cell model, the atRA concentration, the moment of atRA addition in the culture medium and the time of ERK phosphorylation measurement could explain the difference. Bost et al (Bost et al., 2002) used an ES cell line and 10^{-7} M atRA (instead of 10^{-6} M). Reffas and Schlegel (Reffas et Schlegel, 2000) added 10^{-7} M atRA at D0 of P19 cell aggregation. Both groups observed a transient (few hours) activation of ERK upon addition of atRA and our first measurements were done after 24 h. On the other hand, under our conditions, we observed a transient activation of ERK at D2 of differentiation in absence of exogenous atRA, perhaps precluding any further important activation of ERK by atRA. Second, Bost et al (Bost et al., 2002) reported an inhibition of adipogenesis by 40 μ M of the ERK inhibitor PD98059 whereas we observed increased adipogenesis in P19 cells induced by TTNPB, a retinoid decreasing ERK phosphorylation, and no adipogenic inhibition in cells treated with atRA and 10 μ M PD98059. On the one hand, there could be a dosage effect as mentioned above for P38 (Eriksson et Leppa, 2002 ; Graichen *et al.*, 2008 ; Molina *et al.*, 2009). On the other hand, we could have obtained different results by adding ERK inhibitor before the peak of ERK phosphorylation at D2. With respect to myogenesis, the importance of ERK in this phenomenon is still not clear. Kempf et al (Kempf et al., 2011) found that the anti-cardiomyogenic action of strong P38 inhibition was accompanied by reduced ERK phosphorylation but the ERK effect was not isolated. Otherwise, ERK inhibition was reported to have no effect on sarcomeric myogenesis in protocols that did not use atRA as the inducer, such as the spontaneous generation of CM

and SKM in ES cell cultures (Bost et al., 2002) or the DMSO-induced myogenesis in the P19 model (Davidson et Morange, 2000 ; Enarsson *et al.*, 2002). In our atRA-based protocol, the combination of ERK inhibitor with atRA increased both SKM and CM.

In conclusion, in the P19 model, the activation of RAR at D2 of the differentiation protocol conjointly with the inhibition of ERK or P38 signaling is adipogenic. Incorporating the activation of RXR leads to the generation of CM and SKM together with adipocytes. The dosage of ERK or P38 inhibition can be adjusted to increase the myogenic yield. AtRA analogs are mainly characterized by their capacity to bind to and transactivate nuclear RAR and RXR. Effects on phosphorylation dynamics could provide a supplementary criterion in the design or selection of retinoid morphogens capable of directing mesodermal differentiation.

8.7 Acknowledgements:

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research. Studentships afforded to F.B. by the UQAM's FARE program and Pharmaqam Research Center are gratefully acknowledged. We are also indebted to Drs. Jennifer C. Moore and Christine L. Mummery (Department of Anatomy and Embryology, Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands) for the generous gift of P19CL6-MLC2v-GFP cells, and to Dr. Reid P. Bissonnette (Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA, USA) for graciously providing the LG100208, LG100268 and LG100815 ligands. The authors declare no conflict of interest.

8.8 Table and Figures

Table 8.1. Primers and qPCR conditions

Primer name	Primer sense (S) and antisense (AS) sequences	Temperature of annealing (°C)	Product size (bp)	Reference or accession number
β -Actin	S: gccctggctcctagcacc AS: ccaccaatccacacagagtactgg	60	74	(Krook et al., 2002)
GAPDH	S: cgacccttcattgacctcaac AS: ctccacgacatactcagcacc	55	190	(Liu et al., 2005)
LPL	S: aactgccacttcaaccacagca AS: ataatgttgctgggcccgat	60	168	NM_008509
PPAR γ	S: ccagagtctgctgatctgcg AS: gccacctcttgctctgctc	55	217	(Fujita et al., 2005)

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; LPL, lipoprotein lipase; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ .

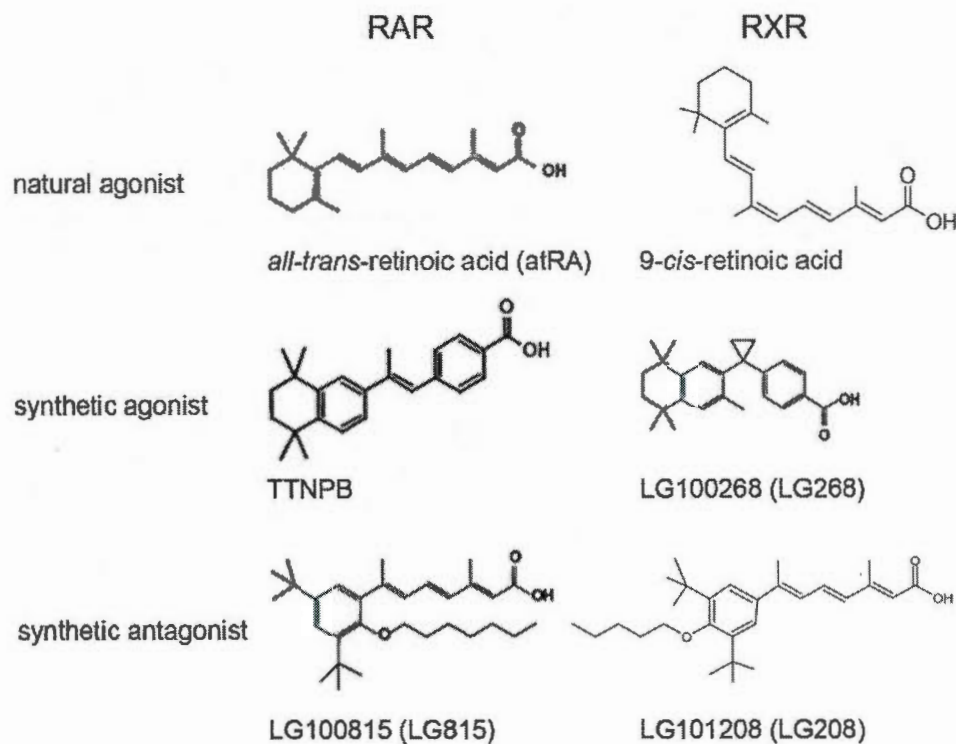


Figure 8.1 Structure of retinoids. *All-trans*-retinoic acid and 9-*cis*-retinoic acid are physiologically-relevant prototype ligands of RAR and RXR respectively. TTNPB and LG100815 are, respectively, synthetic RAR pan-agonist and pan-antagonist. LG100268 and LG101208 are, respectively, synthetic RXR pan-agonist and pan-antagonist. Une version électronique est fournie (CD).

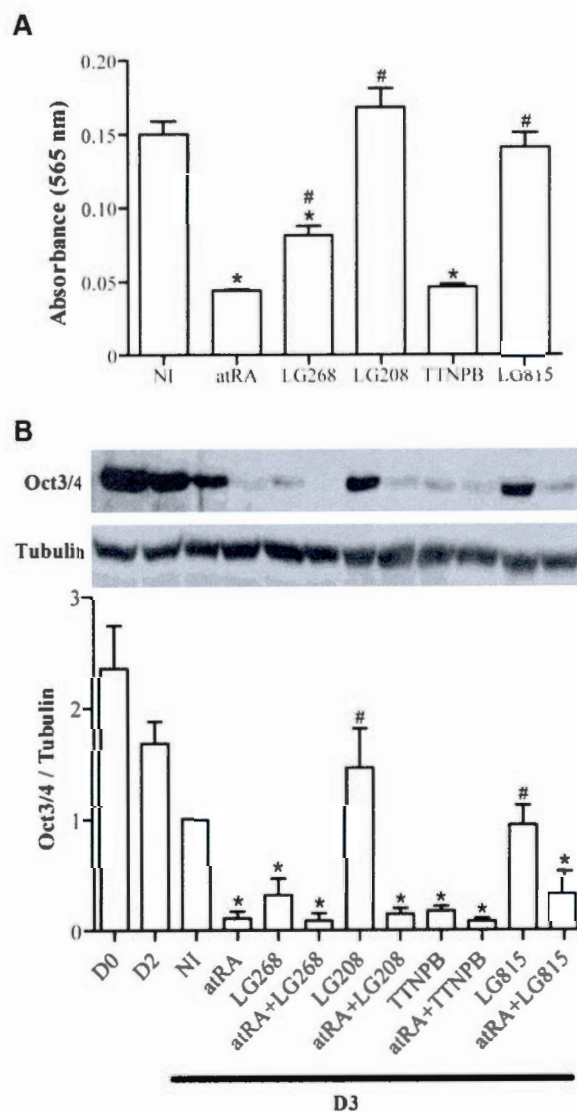


Figure 8.2 RAR and RXR agonists reduce the proliferation and stemness character of P19-MLC2v-GFP cells. (A) Cell proliferation. Cell monolayers were treated for 48 h with no inducer (NI) or with the indicated retinoid, and stained with crystal violet. Absorbance values are expressed as the means \pm SEM of three independent studies. (B) Cell stemness. Cells were subjected to the mesodermal protocol in the absence (NI) or presence of the indicated retinoid inducer from D2 to D3, and analysed for Oct3/4 expression at D3. Cells were also collected at D0 (undifferentiated cells) and at D2 (before retinoid treatment) for comparison. An immunoblot specimen and the densitograms (means \pm SEM) obtained from three independent cell series. Oct3/4 is expressed relatively to tubulin. The inducer treatment was significantly different from the NI condition (*), and the retinoid treatment was significantly different from the atRA reference treatment (#) ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

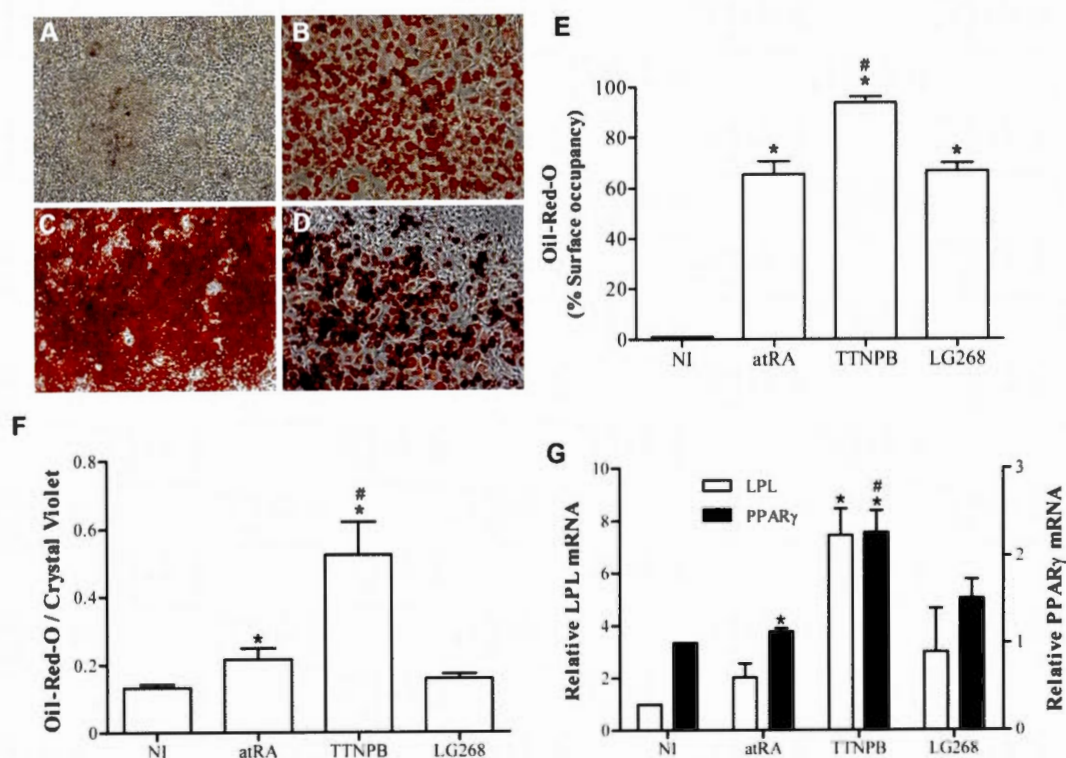


Figure 8.3 TTNPB is a potent adipogenic retinoid. Cell cultures were submitted to the mesodermal protocol and analysed at D7+20. No inducer (NI) or the indicated retinoid inducer was used during the D2 to D5 period. Oil-Red-O staining micrographs (100X) of (A) NI, (B) atRA, (C) TTNPB and (D) LG268 cultures. (E) Percentages of the culture surface occupied by Oil-Red-O stained cells. (F) Histograms of Oil-Red-O absorbances standardized by Crystal violet (CV) absorbances. Oil-Red-O absorbances were higher than expected in NI cultures by comparing with micrography results; this was due to the non-specific trapping of the dye between cells in these highly proliferating cultures. (G) RT-qPCR analysis of LPL and PPAR γ , respectively normalized to β -actin and GAPDH signals. All results (means \pm SEM) are for three independent cell series. The inducer treatment was significantly different from the NI condition (*), and the retinoid treatment was significantly different from the atRA reference treatment (#) (p<0.05). Une version électronique est fournie (CD).

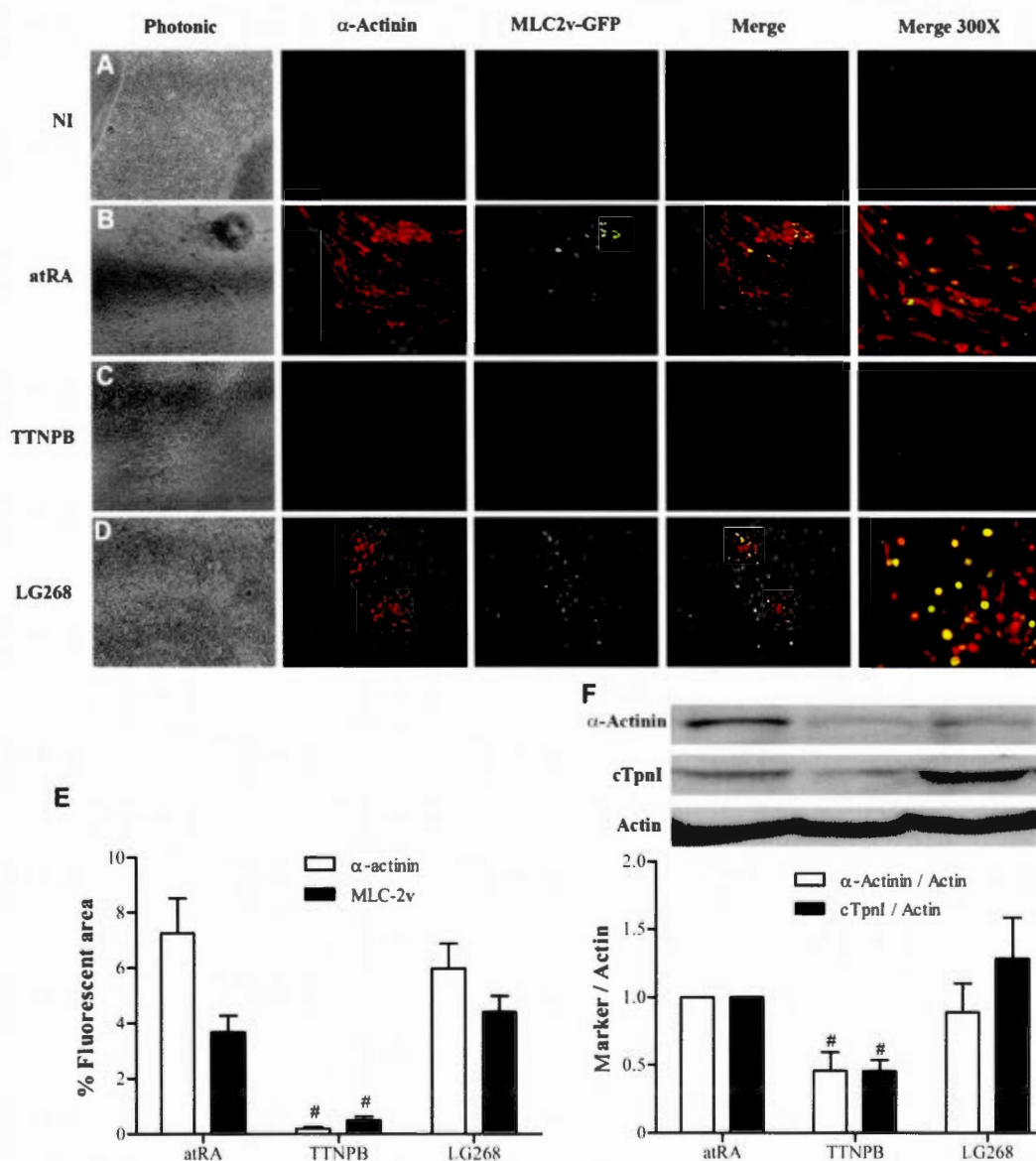


Figure 8.4 Unlike atRA and LG268, TTNPB is anti-myogenic. Cell cultures were submitted to the mesodermal protocol until D7+10 and analysed for GFP and immunoreactive myomarker expression. Fluorescence micrographs (100X or as indicated) of (A) NI cultures and cultures induced with (B) atRA, (C) TTNPB and (D) LG268. Photonic micrographs show the cell culture densities. (E) Relative fluorescence histograms (means \pm SEM of three independent cell series analysed in triplicate). (F) Immunoblot specimens and densitograms (means \pm SEM of three independent cell series). The α -actinin and cTpnI signals were normalized to actin. The retinoid treatment was significantly different from the atRA reference treatment ([#]) ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

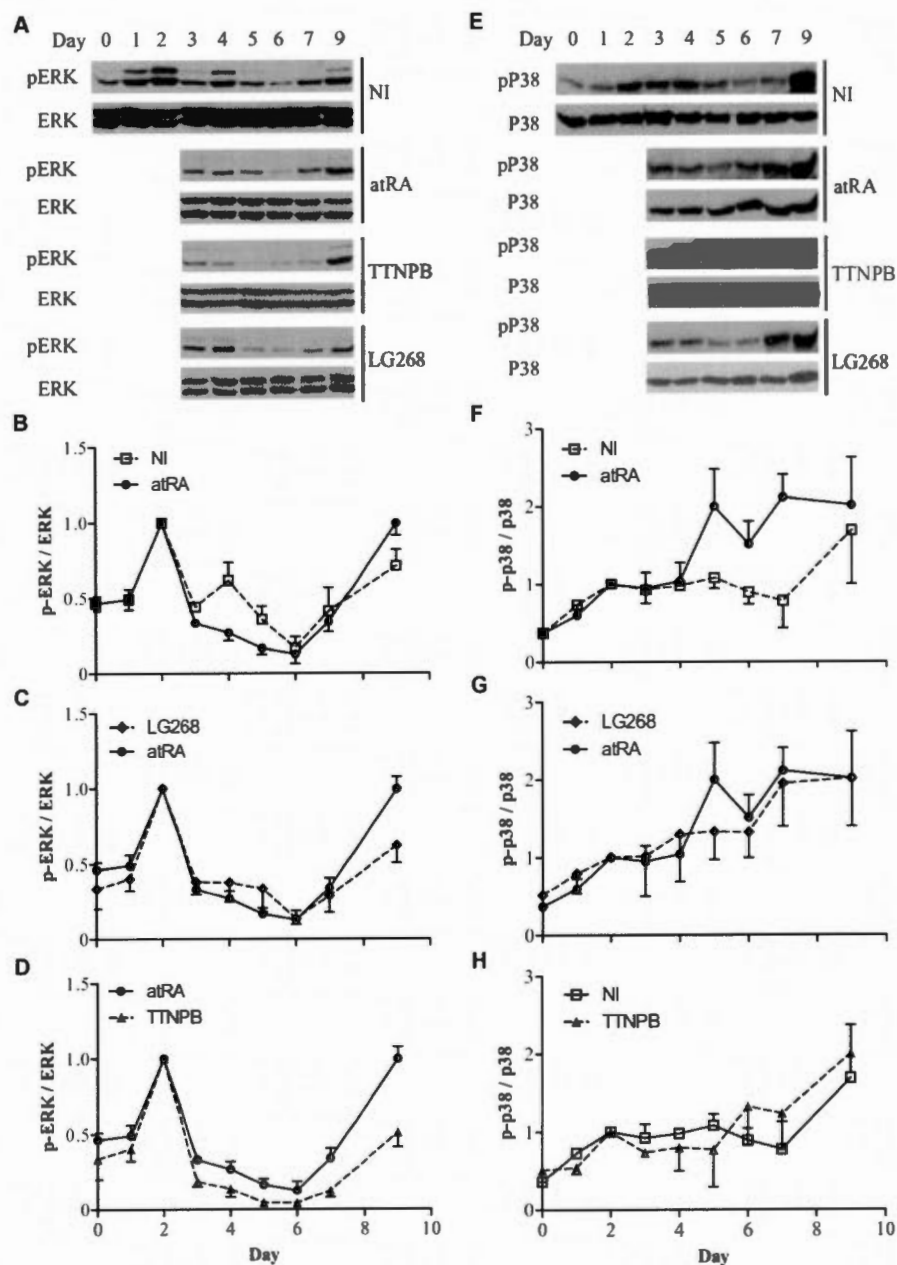


Figure 8.5 Time course of ERK and P38 phosphorylation in differentiating cultures. NI cultures and cultures induced with atRA, TTNPB and LG268 were analysed for phosphorylated (p) and total ERK and P38, daily during the embryoid body period (D0 to D7) and at D9. (A, E) Immunoblot specimens. (B-D, F-H) Comparative densitograms (means \pm SEM of three independent cell series). The results of each series (pERK/total ERK and pP38/total P38) are reported relatively to the corresponding D2. The actin signals (not shown) followed those of total ERK and P38. Une version électronique est fournie (CD).

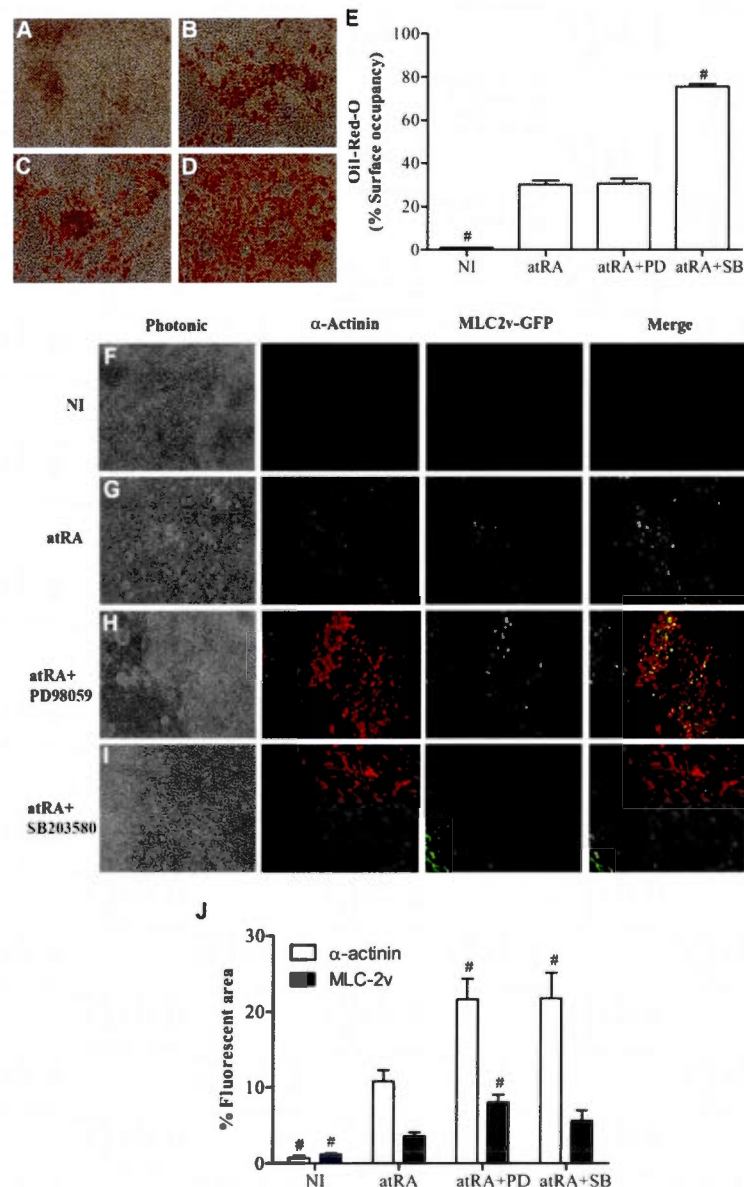


Figure 8.6 The combinations of atRA with MAPK inhibitors are adipogenic and myogenic. Cells were induced with atRA alone or in combination with PD98059 (PD) or SB203580 (SB) from D2 to D5, and analysed for myogenesis at D7+10 and for adipogenesis at D7+14. Oil-Red-O staining micrographs (100X) of (A) NI cultures and cultures induced with (B) atRA, (C) atRA+PD and (D) atRA+SB. (E) Percentages of the culture surface occupied by Oil-Red-O stained cells. (F-I) Myomarker fluorescence micrographs (100X). Photonic micrographs show the cell culture densities. (J) Relative fluorescence histograms. All results (means \pm SEM) are for three independent cell series analysed at least in triplicate. Significant difference from the atRA reference treatment (#) ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

CHAPITRE IX : RETINOIC ACID AND ERK SIGNALINGS TIMELY MODULATE THE MYOGENIC PROPERTIES OF OXYTOCIN IN P19 STEM CELLS

Le travail de ce chapitre fut soumis dans PLoS One, par Frédéric Bouchard et Joanne Paquin. Certaines parties des résultats ont été présentées sous forme de communications dans des congrès:

- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, Le TTNPB, un agoniste des récepteurs de l'acide rétinoïque, est pro-adipogénique et anti-myogénique dans les cellules souches P19. 2^e Colloque annuel du Centre Pharmaquam de l'UQAM. Montréal. 11 juin 2010.
- Frédéric Bouchard et Joanne Paquin, Le TTNPB, un agoniste des récepteurs de l'acide rétinoïque, est pro-adipogénique et anti-myogénique dans les cellules souches P19. 6^e Colloque annuel du Centre de recherches biomédicales de l'UQAM (BioMed). Montréal 28-29 avril 2010.

9.1 Résumé

Les cellules P19 sont un bon modèle d'étude de la différenciation des cellules souches embryonnaires. Le traitement des cellules P19 avec l'OT dès le jour 0 (J0) d'induction de la différenciation génère des CM et quelques cellules de muscle squelettique. Leur traitement avec l'acide *tout-trans* rétinolique (atRA) au J2 d'induction et en absence d'OT génère aussi des myocytes des deux types. L'OT et son récepteur sont sensibles à l'atRA dans le cœur en développement et l'OT peut activer ERK, une protéines-kinase activée par des mitogènes, dans le système reproducteur. Ce travail veut déterminer si l'action myogénique de l'OT dans les cellules P19 peut être modulée par l'atRA et ERK. Lorsqu'ajouté au J0 du traitement avec l'OT, l'atRA inhibe la myogenèse. Cette inhibition impliquerait les récepteurs à l'acide rétinolique (RAR) puisqu'un agoniste des RAR, mais non des récepteurs aux rétinoïdes-X (RXR), est aussi anti-myogénique. Étonnement, lorsqu'ajouté au J2 du traitement avec l'OT, l'atRA augmente grandement la squelettomyogenèse par rapport à la cardiomyogenèse. Les voies des RAR et des RXR participeraient toutes les deux à cet effet de l'atRA puisque les agonistes des RAR et des RXR sont chacun pro-squelettomyogéniques. La phosphorylation d'ERK est augmentée durant le traitement avec l'OT. L'atRA diminue cette phosphorylation de ERK induite par OT de 60% lorsqu'il est ajouté au J0, mais seulement de 20% lorsqu'il est ajouté au J2. Un inhibiteur de ERK, le PD98059, abolit l'action myogénique de l'OT qu'il soit ajouté au J0 ou au J2 de l'induction. BCI, un activateur de la voie de signalisation de ERK, contrebalance l'action pro-squelettomyogénique de l'addition tardive de l'atRA en augmentant la proportion de CM. L'ajout de BCI augmente aussi le niveau de phosphorylation de ERK. La signalisation de ERK influence l'action cardiomyogénique de l'OT. Des niveaux critiques de phospho-ERK régulent la myogenèse de façon temps-dépendante et modulent la proportion de CM et cellules de muscle squelettique dans les cultures.

Manuscript

Retinoic acid and ERK signalings timely modulate the myogenic properties of oxytocin in P19 stem cells

Frédéric Bouchard, Joanne Paquin*

Département de chimie-biochimie and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8

Running title: Retinoic acid and ERK in oxytocin myogenic action

*Corresponding author: J. Paquin (paquin.joanne@uqam.ca), Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8. Phone: (1) 514-987-3000 (ext. 4990). Fax: (1) 514-987-4054.

Abbreviations: atRA, *all-trans*-retinoic acid; BCI, (*E*)-2-benzylidene-3- (cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one; Cardio (protocol), cardiomyogenic (protocol); CM, cardiomyocytes; cTpnI, cardiac troponin inhibitor; DMSO, dimethylsulfoxide; DUSP6, dual specificity phosphatase 6; E subscript, early; EC, embryonic carcinoma; ES (cells), embryonic stem (cells); GFP, green fluorescent protein; HRP, horseradish peroxidase; L subscript, late; MAPK, mitogen-activated protein kinases; α MEM, alpha-modified Eagle's minimal essential medium; MLC2v, myosin light chain-2v; NI, non-induced; NO, nitric oxide; NOS, NO synthase; OT, oxytocin; OTR, oxytocin receptor; PBS, phosphate buffer saline; RAR, retinoid acid receptors; RXR, retinoid-X receptors; SDS, sodium dodecylsulfate; SKM, skeletal muscle cells; TTNPB, (*E*)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl-1-propenyl)-1-propenyl] benzoic acid; TBS, tris buffer saline.

9.2 Abstract

P19 cells provide an useful model of embryonic stem cell differentiation. Their treatment with oxytocin (OT) from day 0 (D0) of differentiation induction generates cardiomyocytes and some skeletal muscle cells. Their treatment with all-*trans*-retinoic acid (atRA) from D2 of induction and in absence of OT also generates both myocyte types. OT and its receptor are sensitive to atRA in the developing heart and OT can activate the ERK mitogen-activated protein kinase in the reproductive system. This work determined whether OT myogenic action in P19 cells can be modulated by atRA and ERK. When added at D0 of OT treatment, atRA inhibited the OT-induced myogenesis. This would involve retinoic acid receptors (RAR) since an agonist of RAR but not of retinoid-X receptors (RXR) was similarly anti-myogenic. Unexpectedly, added later (D2) during OT treatment, atRA tremendously increased skeletomyogenesis over cardiomyogenesis. Both RAR and RXR pathways would participate in this atRA effect since the RAR and the RXR agonists were each pro-skeletomyogenic. ERK phosphorylation was stimulated during OT treatment. AtRA decreased this OT-induced ERK phosphorylation by 60% when added at D0 but only by 20% when added at D2. The ERK inhibitor PD98059 abolished the OT myogenic action whether added at D0 or D2 of induction. BCI, an activator of ERK signaling, counterbalanced the pro-skeletomyogenic action of late atRA addition by increasing the proportion of cardiomyocytes. This was accompanied by higher ERK phosphorylation. ERK signaling likely mediates the OT cardiomyogenic action. Critical phospho-ERK levels time-dependently regulate myogenesis and modulate the proportion of cardiomyocytes and skeletal muscle cells.

Keywords: RAR/RXR, TTNPB, LG100268, cardiomyocytes, skeletal muscle cells, MAPK

9.3 Introduction

Like embryonic stem (ES) cells, P19 embryonic carcinoma (EC) cells are developmentally pluripotent, giving rise to cells derivatives of all germ layers. They allow the study of cell differentiation mechanisms and help in the identification of morphogens to direct cell differentiation. Many ES cell cultures are prone to spontaneous differentiation, in

particular to cardiomyogenesis. P19 cells are more resistant to differentiation, requiring exposure to inducing agents for this process to occur. The secretion of differentiation inhibitors by P19 cells can be one of the mechanisms of their resistance (Kawazoe *et al.*, 2009). Useful complementary information can thus be obtained by comparing the behavior of ES and EC cell models. Inducers of cardiomyogenesis in the P19 cell line can be growth factors as well as small-molecular weight substances. The later include, among others, the organic solvent dimethylsulfoxide (DMSO) and, more physiologically relevant, the vitamin A derivative all-*trans*-retinoic acid (atRA) and the peptide hormone oxytocin (OT) (van der Heyden et Defize, 2003).

OT triggers or enhances the cardiomyogenic differentiation of P19 and ES cells as well as of mesenchymal stem cells of the bone marrow and resident stem cells of the heart (Hatami, Valojerdi et Mowla, 2007 ; Matsuura *et al.*, 2004 ; Paquin *et al.*, 2002 ; Ybarra, del Castillo et Troncy, 2011). OT and its biosynthetic precursors appear to be among the most potent cardiac morphogens in P19 cells (Danalache *et al.*, 2010 ; Danalache *et al.*, 2007 ; Paquin *et al.*, 2002). There is physiological relevance to this finding. OT, together with its receptor (OTR), was found in the adult rat heart where it has a role in cardiac and cardiovascular homeostasis (Gutkowska *et al.*, 2000 ; Jankowski *et al.*, 1998). It is also present in the heart of rodent embryos and neonates (Danalache *et al.*, 2010 ; Jankowski *et al.*, 2004).

The mechanism of OT-induced cardiac differentiation has not been largely explored. This mechanism has common features with those of DMSO and atRA. Indeed, in P19 cells, an OT antagonist completely inhibited the cardiomyogenic effect of OT as well as of DMSO and atRA (Jankowski *et al.*, 2004 ; Paquin *et al.*, 2002), implicating OTR. A synergistic relationship could perhaps exist between OT and atRA pathways in cardiac differentiation since each independently induces cardiomyogenesis (Paquin *et al.*, 2002 ; Rudnicki et McBurney, 1987). OT expression was reported to be sensitive to atRA in some instances (Adan *et al.*, 1993 ; Jankowski *et al.*, 2004). Nitric oxide (NO), which was found to enhance the cardiac differentiation of ES cells (Kanno *et al.*, 2004), mediates the OT cardiomyogenic action. Indeed, the NO-synthase inhibitor L-NAME (that is *N*,G-nitro-L-arginine-methyl

ester) inhibited the OT-induced cardiac differentiation of P19 cells and of porcine mesenchymal stem cells (Danalache *et al.*, 2007 ; Ybarra, del Castillo et Troncy, 2011).

Beside NO and perhaps atRA, mitogen-activated protein kinases (MAPK) could be involved in OT mechanism or modulate OT action during cardiac differentiation. MAPK play a major role in cell differentiation (Aouadi *et al.*, 2006a ; Aziz, Liu et Dilworth, 2010 ; Binetruy *et al.*, 2007 ; Keren, Tamir et Bengal, 2006 ; Zetser, Gredinger et Bengal, 1999). Critical levels of phosphorylated P38 MAPK are necessary to generate cardiomyocytes (CM) from P19 and ES cells, and to stimulate the fusion of skeletal myoblasts into myotubes (Davidson et Morange, 2000 ; Wu *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2000). Contrary to P38, the ERK1/2 MAPK implication into the myogenic differentiation of ES and P19 cells is not clear. Inactivation of ERK1/2 was either found to inhibit or to have no impact on cardiac differentiation (Bost *et al.*, 2002 ; Eriksson et Leppa, 2002). On the other hand, OT stimulates ERK1/2 phosphorylation in the female reproductive system (Devost, Wrzal et Zingg, 2008 ; Wrzal *et al.*, 2012a) and NO enhances ERK1/2 and P38 phosphorylation in the vascular system (Doronzo *et al.*, 2011 ; Lepicier *et al.*, 2006).

We therefore postulated that the OT cardiomyogenic action in the P19 cell model can be modulated by atRA and ERK1/2 signalings. Even perhaps the combined action of OT and atRA could enhance the myogenic yield, possibly through ERK1/2 phosphorylation. AtRA was added at two different times during OT treatment to evaluate temporally mediated effects. AtRA was also replaced by TTNPB (that is, (*E*)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl] benzoic acid), pan-agonist of retinoic acid receptors (RAR), or by LG100268, pan-agonist of retinoid-X receptors (RXR), to distinguish RAR and RXR implication. ERK1/2 phosphorylation was followed during OT treatment, and the myogenic impact of PD98059 and BCI (that is, (*E*)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one), respectively inhibitor and activator of ERK signaling, was also evaluated. The P19CL6-MLC2v-GFP clone of P19 cells was used in this work. This clone, named P19-MLC2v-GFP throughout, carries the green fluorescent protein (GFP) gene under the transcriptional control of the ventricular myosin light chain-2v (MLC2v) promoter (Moore *et al.*, 2004). Apparition of the GFP fluorescence in the differentiating cultures

reports the generation of CM. The cardiac troponin inhibitor (cTpnI) and the sarcomeric α -actinin were also used as myomarkers.

9.4 Materials and Methods

9.4.1 Culture and differentiation of P19-MLC2v-GFP cells

Cells were routinely cultured at 37°C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂, and in a propagation medium consisting of alpha-modified Eagle's minimum essential medium (α MEM; Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada), 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin (HyClone Laboratories, South Logan, Utah, USA) (Bouchard et Paquin, 2009). Passages were done every two days using trypsin and EDTA. The cardiomyogenic (Cardio) protocol using OT as the inducer was as described (Paquin et al., 2002). Briefly, P19 cells were cultured as floating aggregates for 4 days (D0 to D4) in propagation medium containing 10⁻⁷ M OT, and as adherent cultures for the next 10 days (D4+10) in absence of OT (Fig 9.1). In some experiments, a retinoid, either atRA, TTNPB or LG100268 (LG268, a gift from Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA) was added during the OT treatment. Addition was either done early (E subscript), that is at D0, or late (L subscript), that is at D2, and the retinoid remained present until D4 (Fig. 9.1). The ERK1/2 inhibitor PD98059 (10 μ M, Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada) or the ERK activator BCI (0.1 μ M, a gift from Dr. M. Tsang, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA) was added during the induction period as indicated in the legend of Fig. 9.1 and in Results.

9.4.2 Cytofluorescence

Cells grown in wells of 12 well-tissue culture plates were fixed for 20 min in phosphate buffer saline (PBS) containing 4% *para*-formaldehyde, rinsed in PBS and stored at 4°C in this buffer until analysis. Cells were permeabilized for 10 min in PBS containing 1% Triton X-100, blocked for 60 min in PBS containing 1.5% horse serum, and successively incubated, for 60 min each time, with mouse anti-sarcomeric (skeletal and cardiac) α -actinin antibody (clone EA-53; Sigma-Aldrich) and rhodamine-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Cell washes and

antibody dilutions (1/50) were done with PBS containing 1.5% horse serum. Cell micrographs (for the analysis of immunofluorescently-marked sarcomeric α -actinin and of transgenic GFP) were taken with a Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc camera mounted on a Nikon Eclipse Ti microscope equipped for epifluorescence. The fluorescence signals were analyzed with Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) using the threshold function.

9.4.3 Gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were washed with PBS, lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)) containing protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich) and the phosphatase inhibitors sodium orthovanadate (1mM) and sodium fluoride (1mM), and stored at -20°C until analysis. Protein concentration was estimated with a Micro BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Protein aliquots (40 μ g) were loaded onto 10% polyacrylamide-SDS gels, electrophoresed for 60 min at 150 V using a MiniProtean TetraCell system (BioRad, Hercules, CA, USA), and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for 30 min, at 100 V, using a Criterion Blotter apparatus (Biorad). Membranes were blocked for 60 min in Tris buffer saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 and 3% bovine serum albumin, and successively probed (60 min each time) with the primary antibody (dilution 1/1000) and the horseradish (HRP)-conjugated secondary antibody (dilution 1/10000). Antibody incubations and membrane washes were done in TBS containing 0.1% Tween-20. Immune complexes were revealed by incubation of membranes with ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, ON, Canada) and exposition to HyBlot CLTM films (Denville Scientific, Toronto, ON, Canada). Films were analysed by densitometry using Image J software (National Institutes of Health). Rabbit anti-ERK1/2 and anti-phospho-ERK1/2 antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) and goat anti-cTpnI (D-12) antibody from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Membranes were reprobbed with mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) for normalization. Secondary antibodies, conjugated to HRP, were from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

9.4.4 Statistics

The JMP IN 8.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for statistical analysis. Means between cell populations were compared using Tukey-Kramer or test of the means (significance level $p < 0.05$). Results were obtained from three independent cell series.

9.5 Results

9.5.1 Retinoids timely modulate the myogenic properties of OT

In the OT-based Cardio protocol, the OT inducer is added at the beginning of the differentiation protocol (D0) and is present until D4. Generation of skeletal muscle cells (SKM) accompagnies cardiomyogenesis in this protocol but SKM are less abundant than CM (Danalache et al., 2007). CM and SKM can also be obtained, in the absence of OT, by treating cells with 10^{-6} M atRA in a different time window of induction, that is two days after the beginning of the aggregation period (Bouchard et Paquin, 2009). In this work, we compared the myogenic response of cells following the introduction of atRA as well as each of the TTNPB and LG268 retinoids at two time points of OT exposure, namely at D0 (referred to as early addition) and at D2 (referred to as late addition) (Fig. 9.1). In each case, the treatment lasted until D4. The retinoids were used at 10^{-6} M for two reasons. First, this is the atRA concentration generating myocytes in absence of OT (Bouchard et Paquin, 2009) and second, all three retinoids have similar K_d values, in the 10 nM range, for their cognate RAR/RXR (Boehm et al., 1994 ; Boehm et al., 1995 ; Crettaz et al., 1990 ; Vuligonda, Lin et Chandraratna, 1996). We used sarcomeric α -actinin as a marker of both CM and SKM. In cytofluorescence, morphology can also identify the myocyte type with CM having a rounded appearance and SKM an elongated shape. Green fluorescence brought by the cardially-driven GFP expression and yellow fluorescence due to the combined detection of sarcomeric α -actinin and GFP further distinguished CM. Fluorescence micrographs of D4+10 cultures induced with OT alone showed the generation of yellow globular islets (Fig. 9.2B). This omnipresent yellow color indicated that cardiac muscle cells predominated over skeletal muscle cells in these cultures (Figs 9.2B, F). No brilliant green or red fluorescence was seen in non-induced (NI) cultures (Fig. 9.2A). Used in combination with OT, atRA added early (OT+atRA_E) as well as TTNPB (OT+TTNPB_E) inhibited OT-induced myogenesis (Figs 9.2C,

D, F). In fact, there were very rare red or green fluorescing cells in these cultures. This anti-myogenic action would be mediated by RAR and not RXR since combining OT with LG268 (OT+LG268_E) generated almost as many sarcomeric α -actinin^{POS} cells in the cultures as OT treatment (Figs 9.2E, F). The combination also generated cells showing expression of the GFP marker of cardiac phenotype although in lower yield than that seen with OT alone.

We then tested the effect of the retinoid ligands added later during OT exposure (OT+retinoid_L), that is from D2 to D4 instead of D0 to D4 (Fig. 9.3). All three retinoids reduced the cardiomyogenic action of OT as evidenced by GFP cytofluorescence (Figs 9.3A-F) and by cTpnI immunoblotting, a general cardiomyocyte marker (Fig. 9.3G). TTNPB had the highest inhibitory action. Unexpectedly, all three increased the expression of the α -actinin myomarker, in the order of atRA >> LG268 > TTNPB, revealing their stimulating action on overall OT-induced myogenesis (Fig. 9.3F, G). The results indicate that the retinoids, more importantly atRA, appeared to increase the proportion of SKM vs CM in the cultures when added late in the Cardio protocol. The skeletomyogenic action of atRA would thus involve RXR and RAR pathways.

9.5.2 OT and atRA influence the phosphorylation of ERK1/2

The time course of ERK1/2 phosphorylation showed a slight enhancement by OT at D3 and D4, possibly maintained until D7 (Fig. 9.4A). The addition of atRA at D0 (OT+atRA_E) importantly decreased ERK phosphorylation by 60% in the first days of induction (D2-D4) but not of the maturation period (D7) (Fig. 9.4B). When addition was done at D2 (OT+atRA_L), the inhibitory action of atRA on ERK1/2 phosphorylation was modest, reaching 20% (Fig. 9.4C). The timing of atRA addition thus influenced the level of ERK1/2 activation.

9.5.3 ERK1/2 modulators influence the CM and SKM yields

Given the activation of ERK1/2 by OT, we questioned whether this MAPK has a role in OT-induced myogenesis. This is indeed the case. Early as well as late addition of PD98059, an inhibitor of ERK1/2 phosphorylation, completely blocked myogenesis. Compare to cultures treated with OT alone, cultures treated with OT + PD98059 resembled more the NI

cultures, showing rare and faintly fluorescing cells (Figs 9.5A-C, D). BCI was recently shown to be an indirect activator of ERK phosphorylation by inhibiting the dual specificity phosphatase 6 (Dusp6, also called MKP3) which acts on phosphorylated MAPK (Molina et al., 2009). Interestingly, treatment with BCI was reported to expand the cardiac cell lineages in the zebrafish embryo (Molina et al., 2009). Although not examined in P19 cells, Dusp6 is expressed in undifferentiated ES cell lines (Adler et al., 2008). We used BCI (0.1 μ M) in the highly pro-myogenic OT+RA_L conditions to determine whether this agent would increase the CM yield. BCI almost doubled the number of GFP-expressing cells while having less impact on cells expressing sarcomeric α -actinin, thus enhancing the ratio CM/SKM (Figs 9.5D-F). This effect was associated with a slight increase in ERK1/2 phosphorylation (Fig. 9.5G). Increasing BCI concentration beyond 0.1 μ M revealed to be cytotoxic, killing most of the cells within 24h.

9.6 Discussion

Upon exposure to the OT hormone, P19 cell aggregates differentiate into CM and SKM, with a predominance of CM (Danalache *et al.*, 2007 ; Paquin *et al.*, 2002). The combination of atRA with OT brought interesting results. First, atRA had a profound impact on the myogenic action of OT and this, in a time-dependent fashion. Added early in OT treatment, it completely inhibited myogenesis whereas added later, it enhanced myogenesis and even increased the SKM/CM ratio. The use of RAR and RXR agonists pointed to the involvement of the RAR pathways in the anti-myogenic action of atRA since RXR agonist added early was not anti-myogenic. On the other hand, RAR and RXR pathways would participate in the skeletomyogenic propensity. Second, in accordance with our finding that the blockade of ERK signaling inhibited the OT myogenic action, atRA showed a differential effect on ERK phosphorylation depending on the time of its addition. Added early, it largely decreased the OT-induced ERK activation, in line with its anti-myogenic impact. Added late, its effect on ERK was mitigated, in line with the disappearance of the anti-myogenic impact. The use of the indirect ERK activator BCI in the highly myogenic/skeletomyogenic OT+RA_L background increased both the level of ERK phosphorylation and the CM yield. Thus, ERK signaling is involved in the myogenic action of OT and the modulation of ERK

phosphorylation levels in OT treatment influences the overall as well as the proportional yields of CM and SKM.

MAPK have important implication in cellular differentiation (Aouadi *et al.*, 2006a ; Binetruy *et al.*, 2007 ; Keren, Tamir et Bengal, 2006). In particular, P38 activation is required to commit cells towards the CM and SKM lineages during the spontaneous differentiation of ES cells as well as during the DMSO-induced differentiation of P19 cells (Aouadi *et al.*, 2006b ; Barruet *et al.*, 2011 ; Davidson et Morange, 2000 ; Eriksson et Leppa, 2002 ; Wu *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2000). P38 stimulates the transcription of skeletomyogenic transcription factors (Aziz, Liu et Dilworth, 2010 ; Keren, Tamir et Bengal, 2006 ; Zetser, Gredinger et Bengal, 1999). We found that P38 is also involved in OT-induced myogenesis. Indeed, whether added early or late during the treatment of P19 cells with OT, the P38 inhibitor SB203580 abolished myogenesis (unpublished data).

Compare to P38, the impact of ERK1/2 phosphorylation in sarcomeric myogenesis is less clear, particularly in the commitment stage. One study reported no impact of the inhibition of ERK1/2 in myogenic determination of ES cells (Bost *et al.*, 2002) while another one observed partial inhibition of cardiomyogenesis in P19 cells when ERK1/2 inhibitor was added during the DMSO treatment (Eriksson et Leppa, 2002). In a recent study, the inhibition of cardiomyogenesis in human ES cells by high concentrations of the P38 inhibitor SB203580 was accompanied by reduced ERK phosphorylation (Kempf *et al.*, 2011). The incomplete information on the importance of ERK1/2 in myogenic determination prompted us to explore this aspect in OT-induced myogenesis. In line with our objective, there are reports showing the stimulatory effect of OT on ERK1/2 phosphorylation in various physiological contextes not related to cell differentiation (Devost, Wrzal et Zingg, 2008 ; Wrzal *et al.*, 2012a ; Wrzal *et al.*, 2012b) and the finding that an indirect small molecular weight activator of ERK signaling can expand cardiac cell lineages in the zebrafish embryo (Molina *et al.*, 2009). This works shows that OT treatment induced a modest but long lasting stimulation on ERK phosphorylation and that the direct pharmacological inhibition of ERK signaling abolished the myogenic action of OT. This points to the involvement of ERK in OT myogenic action. Also, in conditions of indirect ERK inhibition during OT treatment (that is,

in early addition of atRA), myogenesis was also inhibited. Interestingly, in an atRA-based mesodermal differentiation protocol wherein CM, SKM and adipocytes are generated in absence of OT (Bouchard et Paquin, 2009), we observed that TTNPB, like atRA, inhibited ERK phosphorylation (Bouchard and Paquin, submitted/chapitre 8). This is consistent with the anti-myogenic action of early TTNPB addition on OT-induced differentiation. AtRA lost part of its capacity to inhibit the OT-induced ERK phosphorylation when added late, i.e. at D2 of differentiation. The large size of cell aggregates at D2 compare to the individual cells of D0 could have restrained atRA accession to the cells and, consequently, its action on Erk. Alternatively, OT could have modified the cell homeostasis and thus the cell response to atRA.

Upon treating zebrafish embryos with BCI concentrations as high as 5 μ M, Molina et al (Molina et al., 2009) observed an expansion of the cardiac progenitor pools in these animals. This concentration was however toxic to P19 cells and needed to be diluted to 0.1 μ M for BCI to become tolerated. In the conditions of proficient formation of SKM (OT + atRA_L), BCI, even at this low concentration, increased the CM yield in the cultures. Other regimens of BCI application (for example, higher concentrations for shorter exposures) could perhaps further amplify the CM/SKM ratio. In the presence of OT alone, such a BCI effect was not observed perhaps because OT is already more cardiomyogenic than skeletomyogenic (unpublished).

An unexpected finding of our work is the strong skeletomyogenic action of atRA in the OT+atRA_L treatment. A similar action of atRA in P19 cell cultures was reported by Kennedy et al. (Kennedy et al., 2009) although in different differentiation conditions. These researchers induced differentiation with DMSO while adding low atRA concentrations (10^{-8} - 10^{-9} M) at D0 and found increased SKM/CM ratios compare to DMSO alone. On the one hand, our results add to data indicating some common mechanisms of action for OT and DMSO in cell differentiation. On the other hand, the fact that high concentrations of atRA at D2 and low concentrations at D0 give comparable results could be related to the size of cell aggregates and/or a particular step in differentiation. AtRA concentration gradients can be formed across the large D2 aggregates and recreate, somewhere in the aggregates, the low

atRA concentrations of the D0 procedure. Such atRA gradients are formed in time- and region-dependent manners during development *in vivo* by the differential expression of RA-synthesizing and RA-catabolizing enzymes (Ross *et al.*, 2000 ; White et Schilling, 2008). Alternatively or additionally, there could be an atRA-sensitive step at or around differentiation D2 and the late addition of high atRA concentration could catch up the impact of early provision of lower atRA concentration. Various studies pointed to the multileveled aspect of atRA action in the timing and positioning of myogenesis *in vivo* (Drysdale *et al.*, 1997 ; Kastner *et al.*, 1997b ; Moss *et al.*, 1998 ; Xavier-Neto *et al.*, 2000).

AtRA analogs are useful to distinguish the contribution of RAR and RXR signalings in diverse processes. The anti-myogenic effect of early atRA addition in OT treatment was reproduced by TTNPB, implicating the activation of RAR pathways. In contrast, early addition of LG268 was permissive to the OT myogenic action, which underlines the importance of RXR pathways in myogenesis. Using other RXR agonists, two groups obtained similar findings : Honda *et al* (Honda *et al.*, 2005) under the conditions of the spontaneous cardiac differentiation of ES cells and, contemporaneously to us, Le May *et al* (Le May *et al.*, 2011) in ES cells as well as in P19 cells induced with DMSO. Like us, Le May *et al* observed an increased SKM/CM ratio in the presence of the RXR ligand. Possible links with MAPK signalings were not investigated in those studies.

In conclusion, this work shows the importance of ERK signaling in the OT-induced muscular differentiation of P19 cells. ERK activation is required for the generation of CM and SKM, and the modulation of phospho-ERK levels, either directly with the use of pharmacological modulators or indirectly with the use of atRA, has an impact on the myogenic yields and the CM/SKM ratios. AtRA has a timely contrasted influence on OT myogenic action, being inhibitory when provided early in the differentiation procedure and stimulating when added later. The antimyogenic action of early atRA treatment would be linked to the activation of RAR pathways while the specific activation of RXR pathways, either early or late, remains permissive to cardio- and skeletomyogenesis. Elucidating the intersections of atRA signaling with the OT-ERK pathways requires further investigation.

9.7 Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research. Studentships afforded to F.B. by the UQAM's FARE program and Pharmaqam Research Center are gratefully acknowledged. We are also indebted to Drs. Jennifer C. Moore and Christine L. Mummery (Department of Anatomy and Embryology, Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands) for the generous gift of P19CL6-MLC2v-GFP cells, to Dr. Reid P. Bissonnette (Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA, USA) for graciously providing the LG100268 ligand, and to Dr. Michael Tsang (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA) for providing BCI. The authors declare no conflict of interest.

9.8 Figures

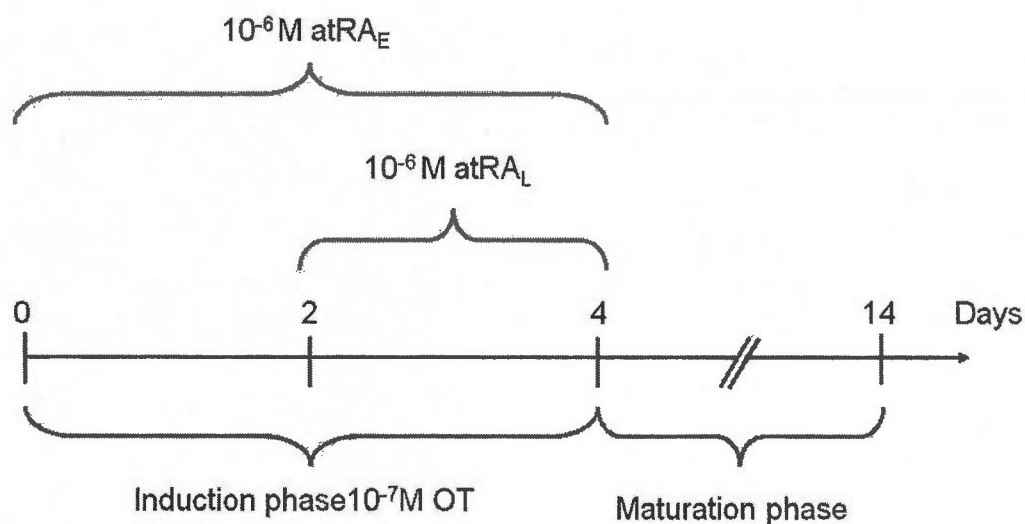


Figure 9.1 Overview of the cardiac differentiation procedure. P19-MLC2v-GFP cells were grown as suspended aggregates (embryoid bodies) during the induction phase in the presence of 10^{-7} M OT (days 0 to 4) and as adherent cultures during the maturation phase in absence of OT (days 4 to 14, also referred to as D4 to D4+10). AtRA (10^{-6} M) was either added early (atRA_E; at day 0) or late (atRA_L; at day 2) during OT induction. In some experiments, TTNPB (10^{-6} M), LG268 (10^{-6} M) or PD98059 ($10 \mu\text{M}$) replaced atRA. When used, BCI ($0.1 \mu\text{M}$) was present from days 0 to 4. Une version électronique est fournie (CD).

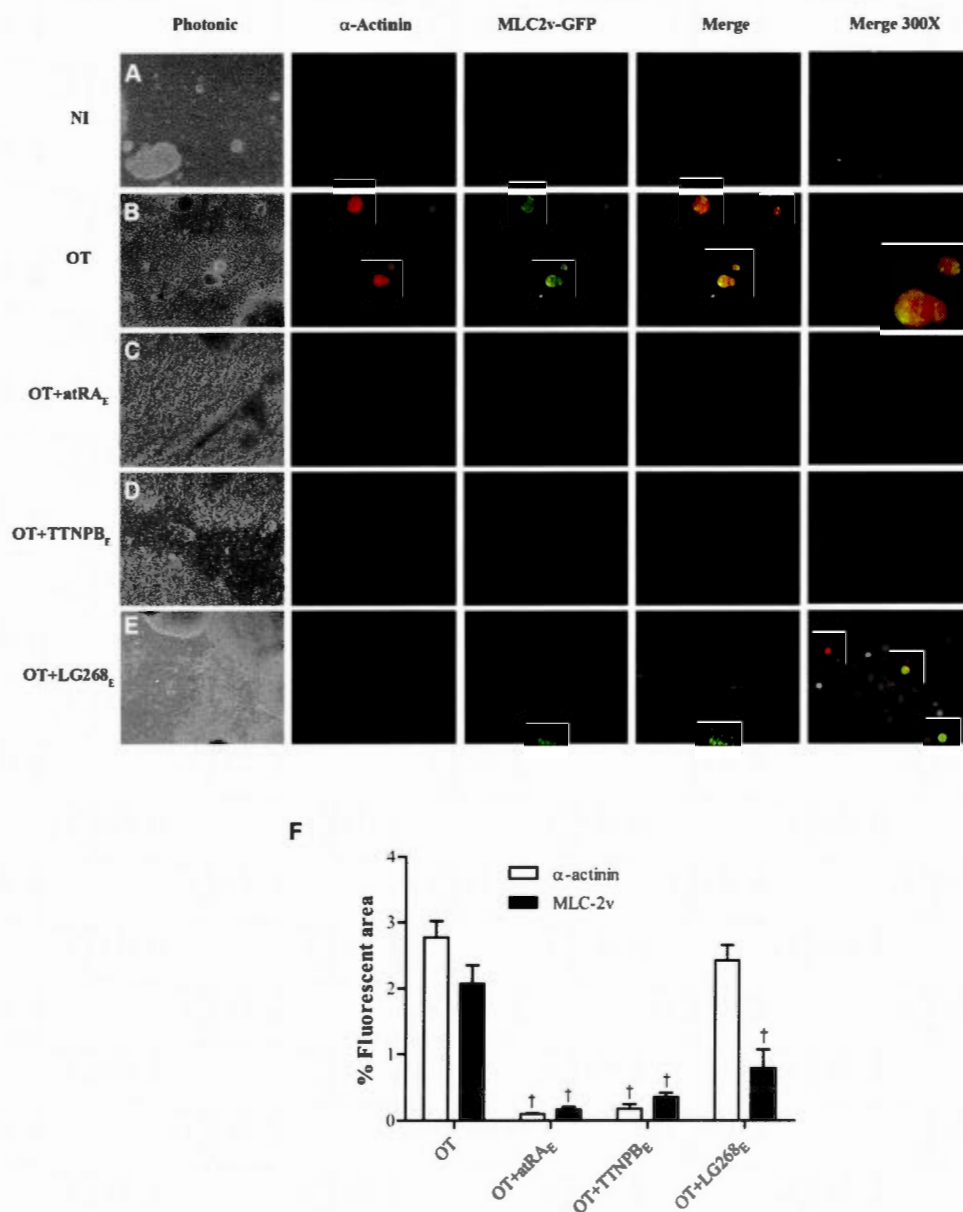


Figure 9.2 Early addition of atRA or TTNPB inhibits OT-induced myogenesis. Cells were submitted to the Cardio protocol until D4+10 and analysed for the expression of GFP and immunoreactive α -actinin. OT and the indicated retinoid were present from D0 to D4. Fluorescence micrographs (100X or as indicated) of NI cultures (A) and cultures induced with (B) OT, (C) OT + atRA_E, (D) OT + TTNPB_E, and (E) OT + LG268_E. Photonic micrographs show the cell culture densities. (F) Relative fluorescence histograms (means \pm SEM of three independent cell series analysed in triplicate). The OT + retinoid treatment was significantly different from the OT reference treatment (\dagger) ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

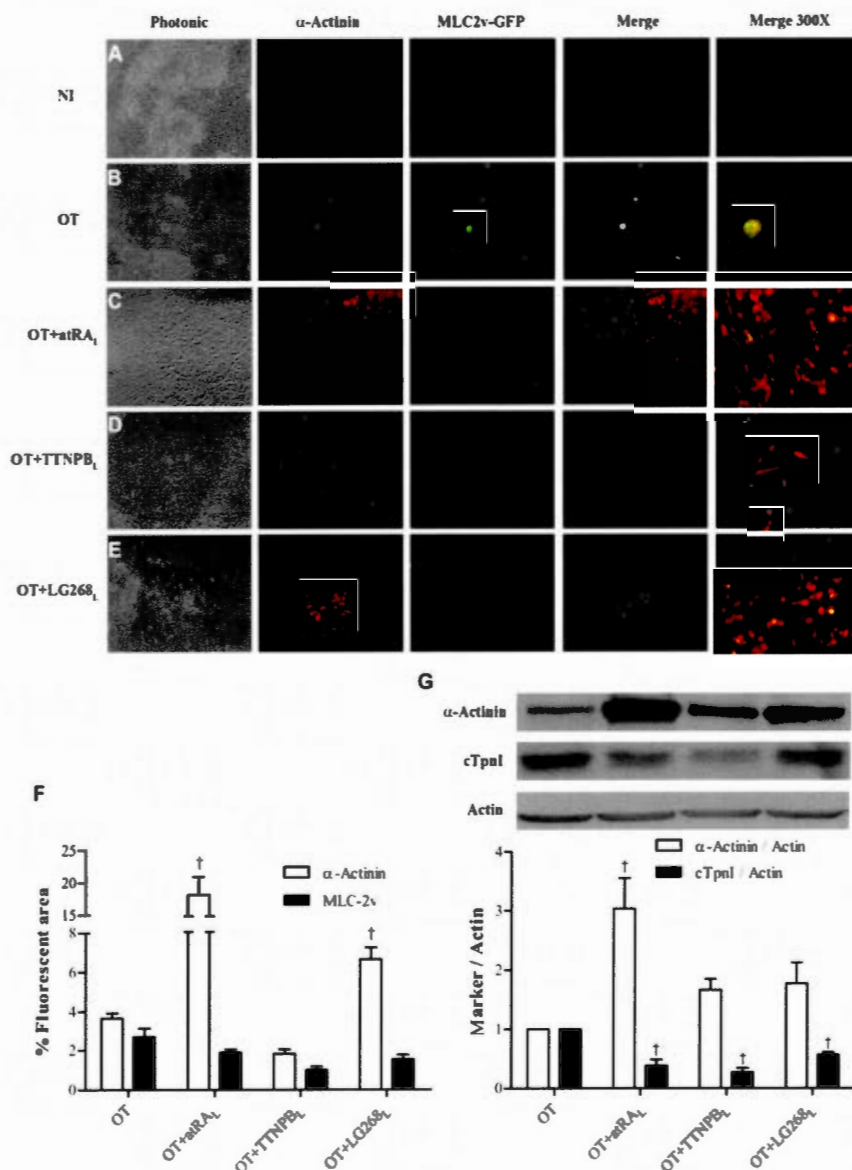


Figure 9.3 Late addition of atRA enhances OT-induced myogenesis. Cells were submitted to the Cardio protocol until D4+10 and analysed for the expression of GFP and immunoreactive myomarkers. OT was present from D0 to D4 whereas each indicated retinoid was present only from D2 to D4. Fluorescence micrographs (100X or as indicated) of NI cultures (A) and cultures induced with (B) OT, (C) OT + atRA_L, (D) OT + TTNPB_L, and (E) OT + LG268_L. Photonic micrographs show the cell culture densities. (F) Relative fluorescence histograms (means ± SEM of three independent cell series analysed in triplicate). (G) Immunoblot specimens and densitograms (means ± SEM of three independent cell series). The α-actinin and cTpnI signals were normalized to actin. The OT + retinoid treatment was significantly different from the OT reference treatment (†) ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

A) OT

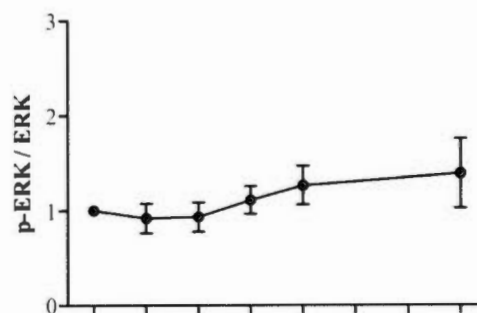
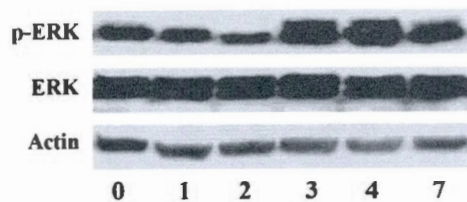
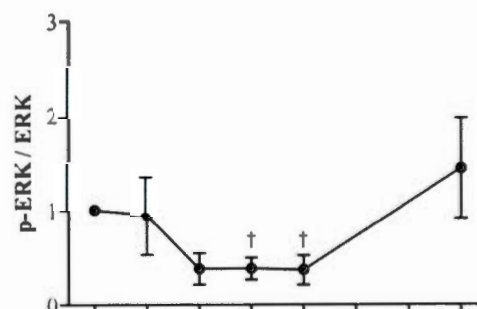
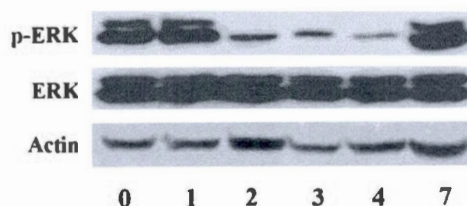
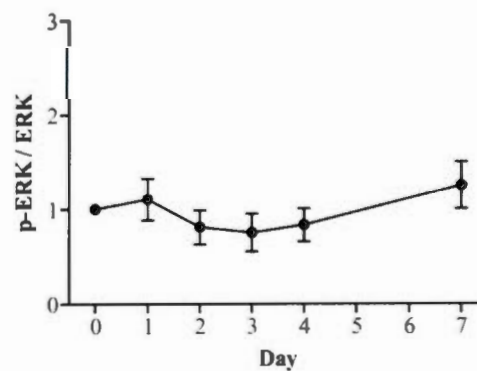
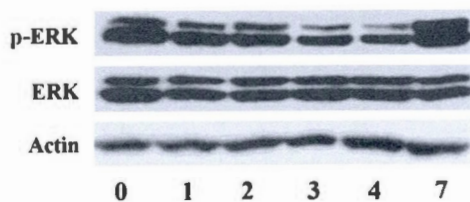
B) OT+atRA_EC) OT+atRA_L

Figure 9.4 Time course of ERK1/2 phosphorylation in the cardiac differentiation procedure. Cultures induced with (A) OT, (B) OT+atRA_E and (C) OT+atRA_L were analysed for ERK1/2 phosphorylation, daily during the embryoid body period (D0 to D4) and at D7. Immunoblot specimens and densitograms (means \pm SEM of three independent cell series) are shown side by side for each treatment. The results of each series were reported relatively to the corresponding D0. Une version électronique est fournie (CD).

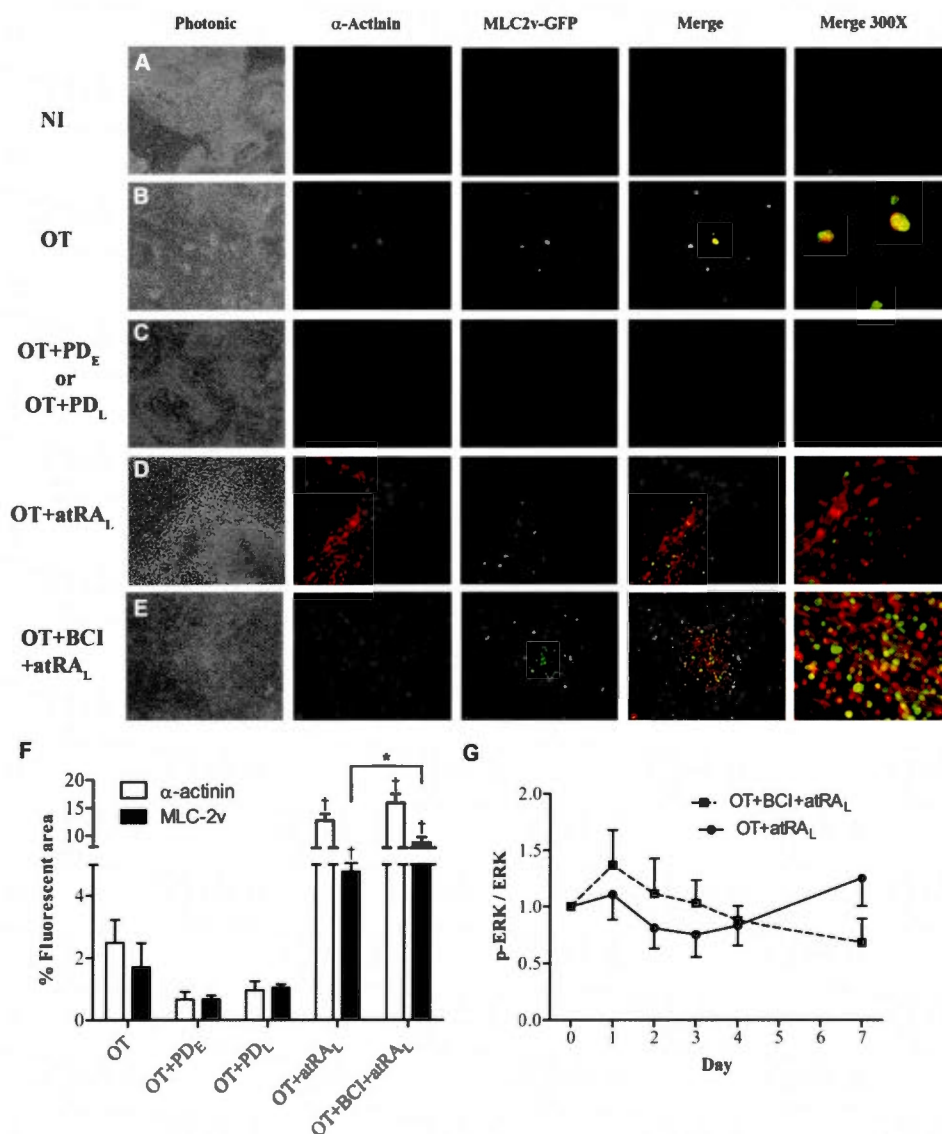


Figure 9.5 Effect of ERK modulators on the myogenic action of the OT+atRAL condition. Cells were submitted to the Cardio protocol until D4+10 and analysed for the expression of GFP and immunoreactive myomarkers. OT and BCI were present from D0 to D4, PD98059 was either added early (PD_E) or late (PD_L) and atRA late (atRAL). Fluorescence micrographs (100X or as indicated) of NI cultures (A) and cultures induced with (B) OT, (C) OT + atRAL, (D) OT + PD98059, and (E) OT + BCI + atRAL. Photonic micrographs show the cell culture densities. (F) Relative fluorescence histograms (means \pm SEM of three independent cell series analysed in triplicate). (G) Densitograms of ERK phosphorylation time course profiles (means \pm SEM of three independent cell series). The OT + retinoid treatment was significantly different from the OT reference treatment (\dagger) and the presence of BCI caused a significant difference in OT + atRAL treatment (*) ($p < 0.05$). Une version électronique est fournie (CD).

PARTIE III
DISCUSSION GÉNÉRALE

CHAPITRE X : DISCUSSION

10.1 Généralités

Les maladies du cœur, qu'elles soient congénitales ou causées par des accidents cardiovasculaires, entraînent des problèmes de croissance, de contractilité et de vascularisation du cœur et sont l'une des premières cause de morbidité et mortalité au Canada et dans les pays industrialisés. Vers l'âge de 65 ans, le ventricule gauche humain contient entre 2 et 4 milliards de CM qui peuvent être réduits jusqu'à 25% de leur nombre initial dans l'heure suivant un infarctus du myocarde (Murry, Reinecke et Pabon, 2006). À partir de 65 ans, le vieillissement induit aussi une diminution moyenne de 20 millions de CM par année en absence de maladie cardiaque comme l'hypertension qui a un effet négatif sur la santé cardiovasculaire (Olivetti *et al.*, 1991). La capacité limitée des cellules du muscle cardiaque adulte de proliférer pose un problème majeur à la restauration fonctionnelle du cœur malade. Les expériences de régénération cardiaque par la thérapie cellulaire ont rapidement évolué, passant du modèle animal à des essais cliniques humains impliquant des milliers de patients (Laflamme et Murry, 2011). Les thérapies cellulaires pour la régénération du cœur nécessitent, aujourd'hui plus que jamais, la compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant la différenciation et la morphogénèse du cœur afin d'être en mesure de manipuler efficacement ces mécanismes (Garry et Olson, 2006). Les cellules P19 sont un bon modèle pour l'étude de la différenciation cardiaque puisqu'elles permettent l'obtention d'un phénotype mature possédant les marqueurs cardiaques et ont un phénotype battant (van der Heyden *et al.*, 2003 ; Zimmermann, 2011). De plus, contrairement aux cellules ES qui se différencient spontanément en CM, les cellules P19 sont résistantes à la différenciation cardiomyogénique et elles permettent ainsi d'identifier des molécules et des conditions cardiomyogéniques efficaces.

Afin de mieux comprendre et de contrôler les mécanismes de différenciation cardiaque, plusieurs approches peuvent être utilisées. Le génie génétique permet de modifier l'expression d'un gène impliqué ou potentiellement impliqué dans la différenciation. Récemment, cette technique a permis de transformer des cellules de phénotype adulte en

cellules pluripotentes ressemblant aux cellules ES (cellules IPS), augmentant l'intérêt de l'étude des cellules ES. L'étude de la différenciation peut aussi être faite par l'ajout d'inducteurs comme des molécules de hauts poids moléculaires (facteurs de croissance protéiques, cytokines, hormones peptidiques). Ce sont des molécules instables dans un milieu biologique, difficiles à produire et à modifier de façon fonctionnelle. D'autre part, les molécules de faibles poids moléculaires comme les vitamines, les hormones stéroïdiennes et divers inducteurs chimiques sont de plus en plus utilisées. Les molécules de cette catégorie sont généralement de structure plus simple, plus facilement modifiable chimiquement et plus stable biologiquement.

L'OT, une hormone peptidique de petite taille, induit ou augmente la différenciation, en CM, de cellules ES, EC et MSC ainsi que celle de cellules souches du cœur (Hatami, Valojerdi et Mowla, 2007 ; Matsuura *et al.*, 2004 ; Paquin *et al.*, 2002 ; Ybarra, del Castillo et Troncy, 2011). En plus d'être l'inducteur offrant un des meilleurs rendements de différenciation cardiaque de cellules EC, l'OT a l'avantage d'être un agent physiologique, permettant son utilisation chez l'humain (Danalache *et al.*, 2007 ; Paquin *et al.*, 2002). Le mécanisme d'action de l'OT aurait des points communs avec celui utilisé par le DMSO et l'AR puisque OTA, un antagoniste de l'OT, inhibe complètement la différenciation induite par OT mais aussi par le DMSO et l'AR (Jankowski *et al.*, 2004 ; Paquin *et al.*, 2002). L'AR est aussi une molécule physiologique qui permet la différenciation cardiaque de cellules EC. L'AR est aussi utilisé avec les cellules ES et les MSC pour la différenciation d'autres types mésodermiques (adipocytes et ostéocytes). Les rétinoïdes (dérivés de l'AR) sont utilisés pour le traitement des tumeurs, mais peu dans la différenciation cellulaire (Altucci *et al.*, 2007 ; Brtko, 2007). Ces molécules, souvent synthétiques, ont l'avantage d'être plus stables métaboliquement que l'AR et elles permettent de cibler plus spécifiquement un récepteur nucléaire. La littérature scientifique rapporte que l'OT, tout comme l'AR, a un impact sur les MAPK dans diverses situations en dehors de la différenciation cellulaire. La littérature montre aussi l'implication des MAPK dans la différenciation cellulaire, principalement l'implication de ERK et de P38 dans la génération de dérivés mésodermiques (Aouadi *et al.*, 2007 ; Barruet *et al.*, 2011 ; Bost *et al.*, 2005a ; Davidson et Morange, 2000 ; van der Heyden et Defize, 2003). Les informations demeurent toutefois incomplètes.

Dans cette thèse nous avons d'abord travaillé avec un protocole de différenciation adipogénique adapté des cellules ES et qui permet d'obtenir aussi des cellules musculaires (Dani *et al.*, 1997). Le premier article montre que les cellules P19 ont un potentiel adipogénique. Les deux autres articles se penchent sur les rétinoïdes et les MAPK. Premièrement, nous avons étudié les relations existant entre l'atRA, des rétinoïdes spécifiques des RAR et RXR, et les MAPK dans la balance adipogénèse *versus* myogénèse en utilisant le protocole adipogénique (aussi appelé mésodermique). Par la suite, nous avons étudié ces relations dans la balance CM *versus* SKM dans le protocole cardiaque à base d'OT.

Dans cette discussion, nous ressortirons les points saillants du travail, qui sont résumés à la figure 10.1, et présenterons des perspectives de développements futurs.

10.2 Les cellules P19 ont un potentiel adipogénique induit par l'atRA.

Nous présentons pour la première fois la différenciation adipogénique de cellules EC P19 (Bouchard et Paquin, 2009). L'obtention d'adipocytes avec les cellules P19 nécessite l'induction avec l'AR à une concentration supérieure à celle utilisée par l'équipe de Dani (Dani *et al.*, 1997) à partir de cellules ES (10^{-6} M vs 10^{-8} M) et l'ajout d'Ins et T3 lors de la maturation. Les adipocytes obtenus sont gorgés de gras et positifs à la coloration à l'huile rouge (Oil-Red-O) en plus d'exprimer fortement les ARNm du facteur de transcription PPAR γ et du transporteur lipidique adipocytaire aP2. Cela est accompagné par une relocalisation nucléaire de la protéine PPAR γ . Alors que la forme protéique de PPAR γ est localisée dans le noyau dans les adipocytes, elle se retrouve dans le cytoplasme des cellules indifférenciées, expliquant la présence d'une forte bande dans les immunobuvardages d'extraits de ces dernières cellules (Fig. 7.1). Les cellules souches indifférenciées expriment plusieurs marqueurs de phénotype adulte qui peuvent s'y retrouver à des niveaux relativement faibles, dans une localisation différente ou encore sous une forme immature i.e. contenant un prodomaine (Choi *et al.*, 2004 ; Dupin, Calloni et Le Douarin, 2010).

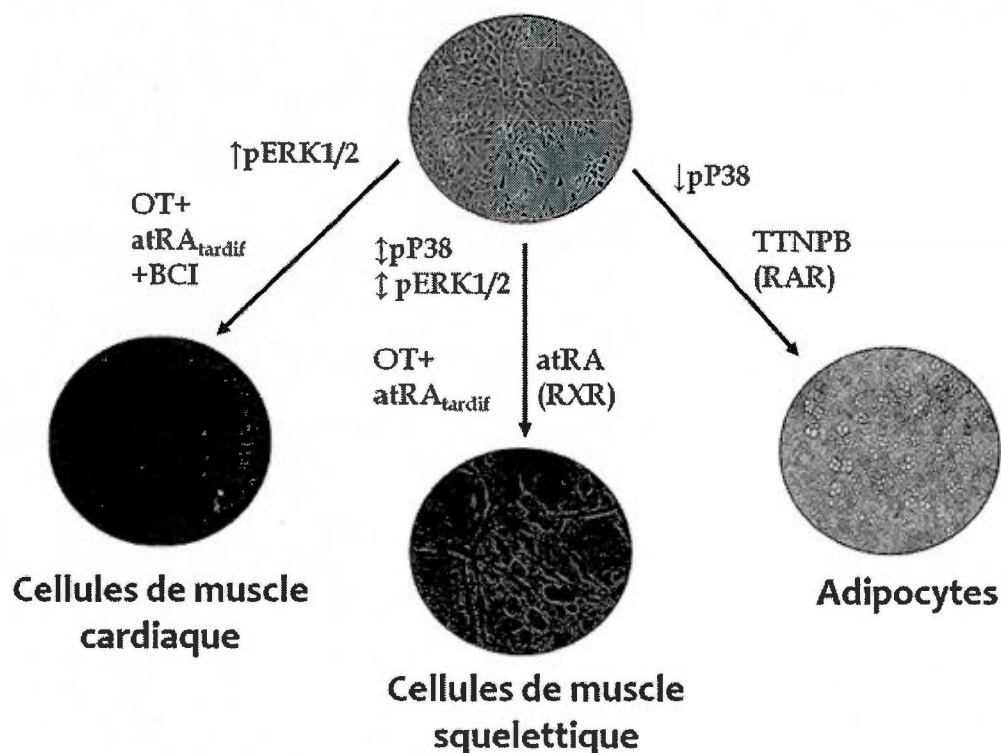


Figure 10.1 Résumé des principaux résultats présentés dans cette thèse. Les rétinoblastes permettent la différenciation des cellules P19 en adipocytes et en cellules musculaires. L'utilisation du TTNPB (un agoniste des RAR) induit une diminution de la phosphorylation de P38 et augmente le rendement de la différenciation adipogénique. L'atRA, via la voie des RXR ou lorsqu'il est utilisé de façon tardive avec l'OT, a peu d'impact sur la phosphorylation de P38 ou de ERK1/2 et permet de stimuler la différenciation musculaire squelettique. Lorsque l'atRA est utilisé de façon tardive, en présence d'OT et d'une molécule augmentant la phosphorylation de ERK1/2 (BCI), il est possible d'augmenter les rendements de la différenciation cardiomyogénique des cellules P19.

En plus de permettre la génération d'adipocytes, l'AR, l'Ins et T3 ont un pouvoir myogénique dans les cellules P19 comme le montrent la présence de cellules battantes ou contractiles dans les cultures ainsi que les niveaux cellulaires élevés d' α -actinine sarcomérique, marqueur des cellules des muscles cardiaque et squelettique, par immunobuvardage (Fig. 7.2). Les zones riches en myocytes montrent la présence de sarcomères en microscopie à fluorescence. Les myocytes présentent deux types morphologiques différents. Les SKM ont une forme allongée, bipolaire, et peuvent s'organiser en fibres multinucléées (myotubes). Les CM sont de forme arrondie et

mononucléée en plus d'exprimer un marqueur général des CM, la cTpnI (Fig. 7.3). L'Ins et T3, ajoutées ici au milieu de maturation, sont des agents cardiomyogéniques des cellules souches adultes et des cellules EC (Bani-Yaghoub *et al.*, 2004 ; Rodriguez *et al.*, 1994). Le protocole de différenciation adipogénique permet une diminution drastique ou peut-être même la disparition complète du marqueur de pluripotence Oct3/4 (Fig. 7.6) ouvrant la porte à des études d'implantation puisque l'absence de cellules indifférenciées diminue le risque de formation d'un tératocarcinome.

L'OT, tout comme la vasopressine, est anti-adipogénique lorsqu'utilisée dans la phase de maturation de fibroblastes pré-adipocytaires de la lignée 3T3 (Wilson et Hollenberg, 1987). L'OT serait aussi anti-adipogénique sur des cellules MSC dérivées du tissu adipeux humain en plus d'y favoriser la différenciation ostéogénique (Elabd *et al.*, 2008). Nous avons pensé que l'effet anti-adipogénique de l'OT pouvait diriger les cellules P19 vers la différenciation myogénique lorsque cette hormone est ajoutée au milieu de maturation dans le protocole adipogénique. L'ajout d'OT à ce milieu n'augmente pas le rendement cardiomyogénique qui demeure similaire au rendement obtenu avec le protocole cardiaque classique (Fig. 7.4) élaboré par Paquin *et al.* (2002). La fenêtre de temps pourrait être importante dans l'effet anti-adipogénique de l'OT. Il serait intéressant de mesurer l'impact de l'ajout d'OT à l'AR dans la période d'induction du protocole adipogénique puisqu'aucun adipocyte n'est obtenu dans le protocole cardiaque à base d'OT.

Il est intéressant de trouver des cellules musculaires dans la différenciation adipogénique puisqu'elles sont, comme les adipocytes, dérivées du feuillet embryonnaire mésodermique. Lors d'une perte de masse du muscle squelettique comme dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne ou celui de la sclérose latérale amyotrophique, la régénération musculaire est accompagnée de l'activation du potentiel adipogénique (Wagatsuma, 2007). Selon l'étude de Wagatsuma, l'expression des facteurs de transcription adipogéniques PPAR γ et C/EBP α serait augmentée à la suite de cette perte musculaire. Les adipocytes jouent aussi un rôle cardioprotecteur : l'adiponectine, cytokine produite et sécrétée par les adipocytes, protège le cœur contre les dommages de l'ischémie-reperfusion (Shibata *et al.*, 2005) tout comme l'adrénomédulline, un peptide sécrété par les adipocytes, protège de la fibrose

cardiaque (Harmancey *et al.*, 2005). Les milieux conditionnés par divers types de cellules mésodermiques pourraient trouver applications dans les thérapies cellulaires. Après récolte des milieux, les cultures mixtes pourraient être traitées en cytométrie de flux pour isoler les types cellulaires précis (ex. CM). L'atRA permet la différenciation des cellules P19 en CM lorsqu'il est utilisé à une concentration de 10^{-7} - 10^{-8} M, et en neurones lorsque la concentration est de 10^{-6} M (Rudnicki et McBurney, 1987). Notre étude montre pour la première fois une action cardiomyogénique de l'AR à forte concentration (10^{-6} M). L'ajout de l'hormone T3, essentielle à l'adipogenèse, dans le milieu de maturation y joue possiblement un rôle. T3 a été démontrée comme étant cardiomyogénique sur les cellules P19 (Rodriguez *et al.*, 1994) et stimulerait également la transcription de la chaîne lourde de myosine alpha (α -MHC) dans le cœur en formation chez le lapin (Morkin, 1993). Finalement, T3 contrôle la division, la différenciation et la fusion des myoblastes squelettiques (Anderson *et al.*, 1998 ; Marchal *et al.*, 1995 ; Shibota *et al.*, 2000), un type cellulaire que l'on retrouve en grande quantité dans nos cultures.

10.3 L'atRA et ses analogues influencent la différenciation mésodermique dans les protocoles adipogénique et cardiomyogénique.

L'AR lie deux familles de récepteurs : les RAR et les RXR, chacune comportant trois isoformes (α , β , γ), afin de former des dimères RAR/RXR ou RXR/RXR et contrôler l'expression génique (Kastner *et al.*, 1997a ; Ross *et al.*, 2000). Sur les cellules P19, l'utilisation d'agonistes spécifiques des RAR (le TTNPB) ou des RXR (le LG268) permet de diminuer la prolifération cellulaire ainsi que l'expression d'Oct3/4 à des niveaux similaires à ceux observés avec l'atRA contrairement aux antagonistes (Fig. 8.2). Ces agonistes sont donc d'excellents candidats comme agents inducteurs de différenciation cellulaire et nous avons vérifié leur effet sur la différenciation mésodermique (adipogénèse et myogénèse). Le remplacement de l'atRA par le LG268 dans le protocole adipogénique permet d'obtenir des adipocytes avec un rendement semblable à celui de l'atRA suggérant l'implication des RXR dans la différenciation en adipocytes induite par l'atRA. C'est la première fois qu'un agoniste des RXR est utilisé dans la phase d'induction de l'adipogenèse dans des cultures de cellules souches. Le LG268 ainsi que l'acide méthoprène, un autre agoniste des RXR, ont déjà été utilisés lors de la maturation terminale de préadipocytes (Brandebourg et Hu, 2005 ; Wang *et*

al., 2000) ; les deux molécules ont eu un effet positif sur la maturation. Le remplacement de l'atRA par le TTNPB, tous deux agonistes des RAR, permet aussi l'obtention d'adipocytes, mais avec un rendement supérieur à celui de l'atRA comme le montre la coloration à l'huile rouge ainsi que la plus forte présence des ARNm de PPAR γ et de la LPL (Fig. 8.3). Les résultats d'une étude toute récente vont dans le même sens que les nôtres. Cette étude montre que RAR β est essentiel à la différenciation adipogénique des cellules ES (Monteiro *et al.*, 2009). Le potentiel adipogénique plus fort du TTNPB peut être dû à une activation prolongée du récepteur nucléaire, une conséquence d'une plus grande disponibilité du TTNPB liée à une moins grande affinité pour les protéines de liaison cytosolique à l'AR (CRABP) ou à une résistance plus grande au métabolisme cellulaire (Eichele, Tickle et Alberts, 1985 ; Pignatello, Kauffman et Levin, 1997 ; Pignatello, Kauffman et Levin, 2002). Des résultats très préliminaires d'analyses HPLC suggèrent une demi-vie plus longue pour le TTNPB que pour l'atRA dans les cultures P19 en différenciation (supervision du stage de premier cycle de Sana Mesbahi). Contrairement à l'agoniste des RXR, les agonistes des RAR agissent différemment en fonction de la fenêtre de temps durant laquelle ils sont ajoutés dans le milieu de culture. Ils stimulent la différenciation adipogénique lorsqu'ils sont ajoutés durant la période d'induction (le présent travail) mais inhibent la différenciation terminale de préadipocytes lorsqu'ils sont ajoutés durant la période de maturation (Brandebourg et Hu, 2005 ; Monteiro *et al.*, 2009 ; Xue *et al.*, 1996).

Le TTNPB agit aussi sur le phénotype myocytaire en inhibant fortement la génération de CM et SKM puisqu'aucune cellule positive pour l' α -actinine sarcomérique n'est aperçue en microscopie à fluorescence. Cette inhibition n'est pas observée avec le LG268 qui montre plutôt une tendance à augmenter la proportion de CM sur les SKM puisqu'un plus grand nombre de cellules sont positives pour le marqueur rapporteur MLC-2v-GFP (Fig 8.4). Cette tendance est aussi observable par immunobuvardage où l'expression du cTpnI, marqueur général des CM, est plus élevée pour la condition LG268 que pour la condition atRA. Ces résultats montrent que la voie des RXR est plus permissive que la voie des RAR et que l'obtention de myocyte avec l'atRA implique une activation des RXR. Comme l'atRA n'est pas le meilleur ligand des RXR, cette activation pourrait se produire à la suite de l'isomérisation de l'atRA en un ligand des RXR (par exemple, le 9-cis-AR) ou à la suite de la

formation d'un hétérodimère RAR/RXR (Sucov et Evans, 1995). Nos résultats rejoignent ceux de deux équipes travaillant avec des agonistes des RXR et montrant que le PA024 et le bexarotène augmentent respectivement la différenciation cardiaque spontanée et la squelettomyogénèse de cellules ES (Honda *et al.*, 2005 ; Le May *et al.*, 2011).

Le TTNPB est aussi antimyogénique dans le protocole cardiaque classique lorsqu'il est mis en même temps que l'OT (Fig. 9.2). Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'atRA remplace le TTNPB et se retrouve tout au long de la période d'induction avec l'OT (OT+RA_E). L'effet anti-myogénique de l'activation des RAR est donc confirmé dans deux protocoles de différenciation. Par contre, lorsque l'activation des RAR par l'atRA est faite tardivement dans le protocole cardiaque, il y a stimulation de la myogénèse (Fig. 9.3 : OT+RA_L). Ce résultat surprenant souligne le fort pouvoir de détermination myogénique de l'OT. L'action myogénique de l'atRA tardif dans le protocole cardiaque impliquerait une activation des RXR en plus de celle des RAR. En effet, l'ajout tardif du TTNPB (OT+TTNPB_L) ne génère qu'un petit nombre de myocytes par rapport à l'OT seule alors que l'ajout tardif du LG268 donne un rendement myogénique plus élevé que celui de l'OT seule (Fig. 9.3). L'atRA se lie préférentiellement aux RAR par rapport aux RXR tout en étant capable d'activer les deux groupes de récepteurs directement ou indirectement. Au contraire, le TTNPB est un activateur spécifique des RAR. L'effet inhibiteur prononcé du TTNPB sur la myogénèse serait dû à cette spécificité puisque l'utilisation du LG268, activateur des RXR, permet la myogénèse aussi bien dans le protocole adipogénique que dans le protocole cardiaque à base d'OT et, dans ce dernier cas, quelque soit sa fenêtre d'utilisation. Dans les trois traitements d'ajout tardif de rétinoïdes, la myogénèse accrue touche les SKM et non les CM.

Kennedy *et al.* (2009) ont aussi rapporté une influence squelettomyogénique de l'atRA dans le modèle cellulaire P19. Leur étude a été réalisée dans le protocole cardiaque à base de DMSO et en présence d'une faible concentration d'atRA. Les auteurs ont proposé un modèle dans lequel l'AR agit sur plus d'une cible dans les voies cardiomyogénique et squelettomyogénique (Fig. 10.2). Ainsi, à faible concentration, l'AR active indirectement les gènes favorisant la myogénèse squelettique via les facteurs de régulation myogénique (MRF)

qui sont MyoD et myogénine et diminue indirectement l'expression de GATA4 par une inhibition de l'expression de BMP4 menant à une inhibition de la cardiomyogénèse (Kennedy *et al.*, 2009). Nous avons aussi favorisé la squelettomyogénèse en jouant avec la fenêtre temporelle d'induction. Une exposition précoce à une faible concentration d'atRA (Kennedy *et al.*, 2009) et une exposition tardive à une forte concentration d'atRA (cette thèse) ont eu le même impact pro-squelettomyogénique. Cependant, une exposition précoce à une forte concentration d'atRA est anti-myogénique (cette thèse). Ces différents résultats peuvent être expliqués par la taille des agrégats (corps embryoïdes) dans la première phase du protocole de différenciation. Lorsque 1 μ M d'AR est ajouté à J0 (conditions anti-myogéniques), son action est égale sur toutes les cellules qui sont en majorité individuelles à ce moment-là. Par contre, à J2, les agrégats sont de bonne taille et peuvent promouvoir la génération d'un gradient de concentration décroissant d'atRA de la surface vers le centre de l'agrégat permettant à certaines cellules de voir une concentration d'atRA ressemblant à celle du protocole de différenciation utilisé par Kennedy *et al.* (2009). Des conditions similaires sont retrouvées *in vivo* dans l'embryon en formation où l'expression différentielle des enzymes de synthèse et de catabolisme de l'AR établit un gradient d'AR de façon dépendante du temps et de la région (Ross *et al.*, 2000 ; White et Schilling, 2008). La fenêtre d'induction est aussi importante dans la différenciation des cellules P19 en neurones où l'ajout de l'AR doit obligatoirement avoir lieu dès le jour zéro (Annexe I). En effet, l'atRA est neurogénique lorsqu'il est ajouté dès le début de la formation d'agrégats mais perd ce pouvoir lorsqu'il est ajouté au jour 2. Le TTNPB et le LG268 se sont révélés être neurogéniques, mais dans un degré moindre que l'atRA, et agissent dans une même fenêtre temporelle que l'atRA.

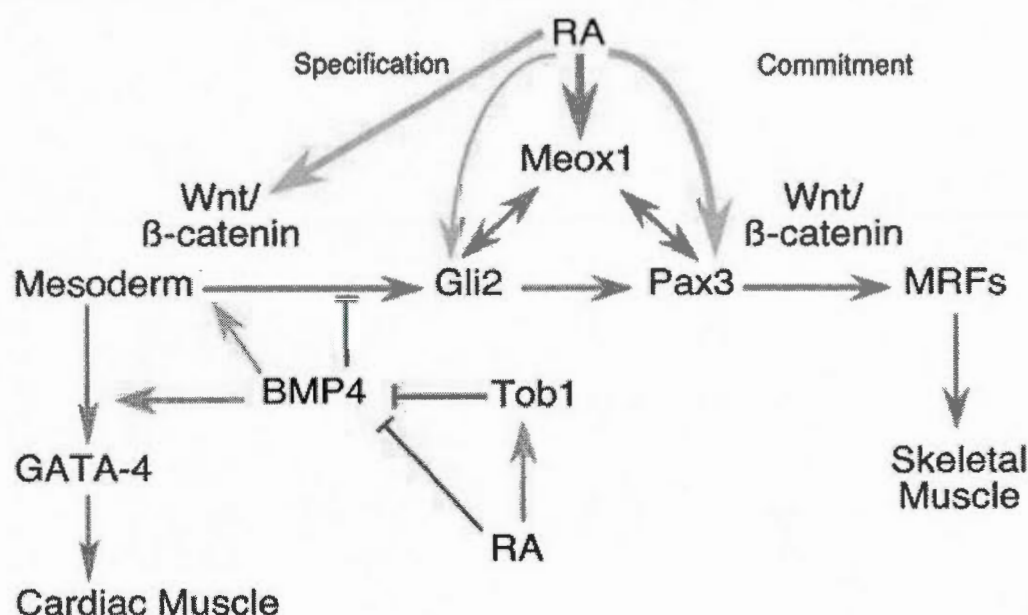


Figure 10.2 Effet de l'AR sur la balance myogénique dans la différenciation de cellules souches P19. L'AR active les facteurs de régulation myogéniques (MRF) via la voie Wnt/ β -caténine menant à la différenciation en cellules du muscle squelettique. L'AR agit aussi sur la différenciation en cardiomyocytes en inhibant le facteur de transcription GATA4 de façon indirecte par une inhibition de BMP4 (Kennedy *et al.*, 2009).

Outre la fenêtre d'induction, la concentration d'AR et de ses analogues mérite d'être davantage étudiée. Dans cette thèse, les agonistes ont été utilisés à la même concentration que l'AR puisque les constantes de dissociation des différents ligands pour leur récepteurs spécifiques sont similaires, de l'ordre de 10 nM (Boehm *et al.*, 1994 ; Boehm *et al.*, 1995 ; Crettaz *et al.*, 1990 ; Vuligonda, Lin et Chandraratna, 1996). Cependant, leur manutention générale par les cellules peut être différente de celle de l'atRA. Par exemple, les quantités d'agonistes qui se rendent au noyau peuvent différer. L'utilisation de combinaisons agoniste-antagoniste constitue aussi une autre stratégie à explorer; elle pourrait permettre l'activation stricte d'une des deux familles de récepteurs RAR ou RXR ou même d'une des isoformes d'une famille donnée. Des molécules bifonctionnelles dont une des fonctions est celle d'un rétinoïde constituent d'autres outils intéressants, encore peu utilisés, pour induire la différenciation des cellules souches. Elles pourraient être utilisées pour augmenter la cardiomyogenèse. Par exemple, la liaison de l'AR avec un butyrate (inhibiteur d'histone-

désacétylase) augmente le rendement de différenciation cardiaque de cellules ES (Maioli *et al.*, 2010 ; Ventura *et al.*, 2008 ; Ventura *et al.*, 2004). Des molécules hybrides combinant la vitamine D et la trichostatine A (TSA), aussi un inhibiteur d'histone-désacétylase, ont été développées comme agent thérapeutique anticancéreux (Lamblin *et al.*, 2010 ; Tavera-Mendoza *et al.*, 2008). Il serait intéressant de complexer la TSA, qui favorise déjà la différenciation cardiaque de cellules ES (Kawamura *et al.*, 2005) et est anti-adipogénique sur les cellules 3T3 (Lagace et Nachtigal, 2004), avec l'AR, un agent favorisant la myogenèse.

10.4 Les MAPK ERK et P38 sont importantes dans les décisions mésodermiques

10.4.1 Les MAPK ERK et P38 dans l'adipogenèse

Parmi les rétinoïdes testés, le TTNPB est celui qui offre le meilleur rendement adipogénique (Fig. 8.3). C'est aussi le rétinoïde qui inhibe le plus fortement la phosphorylation d'ERK1/2 (Fig. 8.5). L'ajout de 10 μ M de PD98059, un inhibiteur de la voie de ERK1/2, au même moment que l'atRA permet l'adipogenèse avec un rendement similaire à celui de l'atRA seul (Fig. 8.6). Nos résultats avec le PD98059 dans les cellules P19 ne sont pas tout à fait les mêmes que ceux publiés avec les cellules ES. Dans les cellules ES, l'ajout du PD98059 à une concentration plus élevée (40 μ M) induit une inhibition de l'adipogenèse et c'est bien la diminution de p-ERK1 qui en serait le responsable (Bost *et al.*, 2005b ; Bost *et al.*, 2002). Selon ces mêmes travaux, ERK1/2 doit être activée pour déclencher la différenciation adipogénique des cellules ES et par la suite inhibée pour permettre la maturation des adipocytes (Bost *et al.*, 2005a). Nous aurions également ces deux moments dans notre modèle puisque l'agrégation cellulaire en l'absence d'inducteur de J0 à J2 active déjà ERK1/2 et l'ajout des rétinoïdes de J2 à J5 diminue la phosphorylation de ERK1/2 (Fig. 8.5). L'ajout d'un inhibiteur de ERK1/2, en supplément à J2, pourrait être trop tardif pour interférer dans l'adipogenèse.

Nous avons aussi analysé l'impact de l'inhibition de P38 sur cette même différenciation puisque le TTNPB est le seul des rétinoïdes utilisés qui n'active pas P38. Le SB203580 (10 μ M) augmente la différenciation adipogénique dès le J7+14 et étonnamment augmente aussi le rendement myogénique des cellules P19 (discuté à la section 10.4.2). Une régulation

négative par P38 de la maturation des préadipocytes a déjà été observée (Aouadi *et al.*, 2007 ; Aouadi *et al.*, 2006c). Bost *et al.* n'ont pas observé de stimulation de l'adipogénèse par le SB203580 dans les cultures de cellules ES soumises au protocole Adipo à base d'atRA mais la concentration utilisée de cet inhibiteur était plus faible que la nôtre (Bost *et al.*, 2002).

10.4.2 Les MAPK ERK et P38 dans la myogenèse

Nous montrons pour la première fois une augmentation de p-ERK1/2 dans la différenciation cardiaque induite par OT. Cette augmentation est visible les troisième et quatrième jours du début de l'induction et possiblement maintenue jusqu'au jour sept. Cette augmentation de p-ERK1/2 est essentielle pour obtenir des CM puisque l'utilisation de l'inhibiteur de p-ERK1/2, le PD98059, provoque une inhibition de la différenciation myogénique peu importe la fenêtre temporelle d'ajout durant l'induction (Fig. 9.5). L'activation de ERK est importante pour la génération de CM par l'icarine (une petite molécule flavonoïde) ou par l'association de LIF et de BMP2 dans les cellules ES (Jin *et al.*, 2010 ; Rajasingh *et al.*, 2007). L'activation de P38 est aussi essentielle à l'obtention de myocytes de type cardiaque ou squelettique dans le protocole de différenciation à base d'OT puisque l'ajout de l'inhibiteur de la phosphorylation de P38 (le SB203580) inhibe la myogenèse, que l'addition se fasse de façon précoce ou tardive (non montré). L'inhibition de P38 durant la période d'agrégation des cellules ES inhibe aussi la différenciation spontanée en cellules cardiaques et de muscle squelettique (Aouadi *et al.*, 2006b ; Barruet *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2010) de même que la différenciation cardiaque des cellules P19 induite par le DMSO (Davidson et Morange, 2000 ; Enarsson *et al.*, 2002).

L'ajout d'atRA dans la même fenêtre temporelle que l'OT (OT+atRA_E), un ajout qui inhibe la myogenèse, induit une forte diminution de p-ERK1/2 de J2 à J4. Par contre, l'ajout d'AR de façon tardive (OT+atRA_L), qui stimule la différenciation en SKM, ne permet pas une diminution aussi drastique de p-ERK1/2 (Fig 9.4). L'utilisation du BCI, un stimulateur indirect de la phosphorylation de ERK2 (Molina *et al.*, 2009) parce qu'il inhibe la phosphatase Dusp6, contrecarre l'effet inhibiteur de OT+RA_L sur p-ERK1/2 et augmente légèrement la différenciation cardiomyogénique (Fig. 9.5). Dans les cellules ES, qui se différencient de façon spontanée en CM, l'inhibition de ERK1/2 n'a pas d'impact sur le

rendement en cellules de muscle cardiaque (Bost *et al.*, 2002) contrairement aux cellules P19 où l'inhibition de ERK1/2 inhibe la différenciation cardiomyogénique (Eriksson et Leppa, 2002). Il serait intéressant de comparer les niveaux endogènes initiaux de p-ERK1/2 dans les deux types cellulaires.

Très peu d'études ont montré l'impact de rétinoïdes sur les MAPK dans la différenciation cellulaire. L'impact de l'AR et l'implication de ERK1/2 et de P38 dans le protocole cardiaque à base d'OT nous amène à nous questionner sur leur action dans un protocole mésodermique à plus large éventail de cellules différenciées, en l'occurrence notre protocole adipogénique. En plus de générer des adipocytes, l'induction avec l'atRA dans le protocole adipogénique permet d'obtenir des myocytes, de type squelettique principalement (Fig. 8.4). Durant cette période d'induction (J2 à J5), on observe aussi une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 et une augmentation de celle de P38 (Fig. 8.5). Des niveaux de phosphorylation similaires sont observés avec le LG268, aussi promoteur de la myogenèse (Fig. 8.4 et 5). Par contre, l'utilisation du TTNPB comme inducteur dans le protocole adipogénique inhibe la myogenèse. Cette inhibition est accompagnée par une diminution de p-ERK1/2 et contrairement au cas de l'atRA, n'a pas d'effet sur la phosphorylation de P38 (fig. 8.5). De ces résultats, on peut penser qu'une plus grande phosphorylation de P38 est favorable à la myogenèse et qu'une plus grande déphosphorylation de ERK y est défavorable. Cela irait dans le sens des résultats obtenus avec des inhibiteurs de ERK et P38 dans le protocole cardiaque à base d'OT.

Par contre, notre observation qu'atRA diminue les niveaux de p-ERK1/2 va à l'encontre d'autres travaux. Ainsi, l'agrégation des cellules en présence de 10^{-7} M d'AR, induit une activation rapide (à l'intérieur de quelques heures) de ERK1/2 dans les cellules P19 (Reffas et Schlegel, 2000) et les cellules ES (Bost *et al.*, 2002). Deux éléments peuvent expliquer la différence entre ces résultats et nos travaux. Premièrement, nous avons utilisé l'AR à une concentration plus élevée (10^{-6} M vs 10^{-7} M). Deuxièmement, nous avons analysé les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 après 24h plutôt qu'après quelques heures. Il est possible qu'une activation rapide de ERK1/2 ait eu lieu dans nos différenciations.

Contrairement à nos attentes, l'ajout de l'inhibiteur de la voie de ERK1/2 à l'atRA entre les J2 et 5 du protocole adipogénique n'inhibe pas la différenciation myogénique. Plutôt, il augmente fortement la squelettomyogenèse et légèrement la cardiomyogenèse (Fig. 8.6). Il est possible que la présence de cellules musculaires s'explique par le fait qu'il y ait déjà eu une augmentation de p-ERK1/2 à J1 et J2 de la formation des corps embryoides en absence d'agent inducteur (Fig. 8.5) et que cette augmentation soit suffisante pour stimuler la détermination myogénique. Comme pour l'inhibiteur de la voie de ERK1/2, l'ajout de l'inhibiteur de la voie de P38 n'inhibe pas mais augmente la myogenèse des cellules P19. La concentration de l'inhibiteur pharmacologique de P38, le SB203580, pourrait être un élément d'explication. En effet, à une concentration supérieure à 15 μM , le SB203580 inhibe la différenciation cardiomyogénique de cellules ES humaines, mais à une concentration inférieure à 10 μM , il stimule cette même différenciation (Graichen *et al.*, 2008 ; Kempf *et al.*, 2011). En ayant travaillé à 10 μM de SB203580, nous aurions aussi stimulé la myogenèse des cellules P19, plus particulièrement la squelettomyogenèse.

L'AR et l'OT influencent chacun la phosphorylation de MAPK et, réciproquement, leur action mésodermique est influencée par des modulateurs pharmacologiques de ces kinases. Le sens des influences peut différer comme le montre le tableau 10.1. Les inhibiteurs PD98059 et SB203580 augmentent la myogenèse induite par l'atRA mais inhibent celle induite par OT. Les cultures induites selon le protocole adipogénique et selon le protocole cardiaque classique ne sont peut-être pas au même stade de différenciation (ou de signalisation) au moment où on ajoute les inhibiteurs de ERK et P38, ce qui pourrait expliquer les actions duales de ces inhibiteurs. Ainsi, des études ont montré que l'activation de P38 stimule l'expansion de cellules progénitrices du muscle squelettique aux dépens de leur différenciation (Gillespie *et al.*, 2009 ; Kook *et al.*, 2008 ; Napolitano *et al.*, 1991) et l'inhibition de ERK stimule la maturation de myoblastes (Favreau *et al.*, 2008). Les actions de ERK et de P38 pourraient dépendre de l'inducteur de différenciation et d'une fenêtre temporelle d'intervention.

Tableau 10.1 Comparaison de rendements myogéniques dans le modèle cellulaire P19

Protocole	Traitement	Rendements
Adipo (Chap. VIII)	RA+PD <i>versus</i> RA	SKM +, CM +
	RA+SB <i>versus</i> RA	SKM +, CM ~
Cardio (Chap. IX)	OT+PD <i>versus</i> OT	SKM -, CM -
	OT+SB <i>versus</i> OT	SKM -, CM -
	OT+RA _E <i>versus</i> OT	SKM -, CM -
	OT+RA _L <i>versus</i> OT	SKM +, CM +
	OT+BCI+RA _L <i>versus</i> OT	SKM +, CM ++

Les symboles +, -, ~ indiquent un rendement accru, diminué ou non changé respectivement.

L'impact myogénique des inhibiteurs de ERK et de P38 en présence d'atRA pourrait aussi être expliqué par l'action non-génomique de l'AR. Elle impliquerait l'existence de RAR ou de RXR à la membrane plasmique. En effet, des études ont montré qu'il existe des RAR α à la surface de certaines cellules (Alsayed et al., 2001 ; Piskunov et Rochette-Egly, 2011) et que la liaison de l'AR à cette sous-population de récepteurs induit rapidement l'activation de P38 ou de la voie phosphatidylinositol-3-kinase (PI3)-ERK avec des répercussions sur l'assemblage des complexes de transcription (Bruck *et al.*, 2009 ; Masia *et al.*, 2007). La voie non-génomique de l'AR implique l'association de RAR α avec la protéine G alpha Q (G α q) au niveau des membranes plasmiques dans des domaines enrichis en molécules de signalisation (les radeaux lipidiques ou *lipid rafts*) telles que les récepteurs couplés à des protéines G, les protéines G hétéromériques ou la famille des Rho GTPases (revue dans Piskunov et Rochette-Egly, 2011). Dans la différenciation cardiaque des cellules P19, l'atRA partagerait des voies de signalisation avec l'OT puisque l'utilisation d'OTA inhibe la différenciation cardiaque induite par l'AR (Jankowski *et al.*, 2004). Il serait intéressant d'approfondir davantage l'implication de RAR/RXR de la membrane plasmique dans cette différenciation, le récepteur de l'OT (OTR) étant un membre de la famille des récepteurs couplés à une protéine G (Devost, Wrzal et Zingg, 2008). Il serait aussi intéressant de vérifier l'impact d'autres rétinoïdes (agonistes et antagonistes spécifiques des RAR ou des RXR) sur cette voie non-génomique de l'AR. Le tableau 10.1 montre aussi que l'ajout tardif de l'AR et l'association d'un activateur de la voie ERK (le BCI) augmentent le rendement myogénique de l'OT.

L'importance des MAPK ERK1/2 et P38 dans la différenciation mésodermique, plus particulièrement dans l'obtention de CM, peut inspirer des stratégies de criblage pour trouver plus rapidement des petites molécules susceptibles d'induire une différenciation des cellules souches de type embryonnaire. Ainsi, dans un premier criblage, des molécules, incluant des rétinoïdes, pourraient être testées pour leur effet sur la phosphorylation d'ERK et de P38 durant la période d'induction sans avoir à attendre l'apparition des phénotypes différenciés. Suite à cette première sélection, les molécules ayant démontrées une action sur ces MAPK pourront être analysées pour leur efficacité à générer des CM en variant leur concentration dans le milieu de culture cellulaire ainsi que la fenêtre temporelle d'application.

La fenêtre temporelle d'ajout de l'AR est importante pour l'obtention d'un phénotype musculaire squelettique. Nous obtenons un meilleur rendement en SKM lorsque AR est ajouté de façon tardive. L'AR diminue la phosphorylation de ERK aussi bien dans le protocole adipogénique que dans le protocole cardiaque à base d'OT. L'ajout de l'inhibiteur de la voie ERK (PD98059) dans le protocole cardiaque inhibe la différenciation musculaire comme le fait l'ajout précoce de l'AR. Par contre, ce résultat vient en contradiction avec le protocole adipogénique où l'ajout de l'inhibiteur de la voie ERK augmente les rendements myogéniques. Il semble que la phosphorylation de ERK doive être stimulée au début de la période d'induction puis diminuée vers la fin de cette même période, comme par exemple par l'ajout d'AR, pour favoriser de bons rendements myogéniques.

10.5 Autres perspectives

La différenciation des cellules souches embryonnaires (ou leurs semblables, les cellules IPS) peut être exploitée dans différentes avenues aussi variées que le développement de thérapies cellulaires ou la conception de modèles de culture pour étudier le développement d'organes. Les cellules souches différenciées peuvent aussi être utilisées pour valider l'efficacité et la sécurité des médicaments, en complément ou en remplacement de modèles animaux, de cultures de cellules primaires ou de cultures de lignées cellulaires. Les CM dérivés de cellules souches auraient une utilité pertinente dans cette optique compte tenu que la mort par cancer est de plus en plus répandue dans une population vieillissante et que les

médicaments antitumoraux montrent une toxicité cardiaque (Monsuez *et al.*, 2010 ; Zimmermann, 2011). Idéalement, le milieu de culture doit être mieux contrôlé. Le sérum, qui induit trop de variation d'un lot à l'autre, devrait être remplacé par un milieu synthétique de composition définie.

L'amélioration des rendements de différenciation passera probablement par un mimétisme de l'environnement *in vivo* du phénotype mature. Nous avons effectué une étude préliminaire sur un support de culture tridimensionnel (3D) en collaboration avec les équipes des Drs Mircea-Alexandru Mateescu et Isabelle Marcotte (UQAM). Nous avons découvert qu'il est possible de cultiver les cellules P19 dans des éponges de fibroïne, une protéine de la soie (Annexe II). La fibroïne offre un matériel bio-compatible pour diverses applications thérapeutiques. La concentration en NaCl lors de la formation des éponges permet d'en contrôler la porosité. Les porosités obtenues ont permis une distribution en profondeur des cellules P19 dans les éponges ainsi que la formation d'agrégats cellulaires essentiels à la différenciation (Byette *et al.*, 2011). Les cellules ont montré une très bonne viabilité. Il serait intéressant de mesurer les rendements de différenciation dans ces supports. Notons que des matériels "cellularisés" pourraient mieux assurer le succès d'implantations cellulaires que des suspensions de cellules libres.

La culture en hypoxie de cellules souches est une autre stratégie d'intérêt dans la différenciation cellulaire. Les cellules souches de l'embryon (Okazaki et Maltepe, 2006), les MSC de la moelle osseuse (Grayson *et al.*, 2007) et les cellules du coeur infarci connaissent des conditions pauvres en oxygène *in vivo*. Le facteur de transcription inductible de l'hypoxie alpha (HIF α) peut être un substrat d'ERK2 dans des cellules cancéreuses du sein. De plus, l'hypoxie de plusieurs lignées de cellules cancéreuses induit une activation des MAPK ERK1/2 et P38 (Michiels *et al.*, 2001). L'inverse est aussi possible, ERK1/2 et P38 peuvent activer HIF-1 (Minet *et al.*, 2001). Des études exploratoires réalisées avec l'équipe du Dr Borhane Annabi (UQAM) montrent que des MSC de souris transfectées avec le gène de la protéine HIF α (MSC-HIF) ont une augmentation des ARNm des marqueurs myogéniques cTnI et MyoD ainsi qu'une diminution du marqueur adipogénique LPL lorsque comparées avec les cellules transgéniques témoins i.e. non transfectées avec le gène HIF α (MSC-AP2)

(Annexe III). Nous postulons que cette augmentation des marqueurs myogéniques pourrait être en partie reliée à une augmentation de p-ERK1/2 dans les cellules HIF α . Lorsque les MSC-HIF α sont mises en présence d'OT pour 24h, elles montrent une augmentation de l'expression de la protéine cTnI par rapport aux MSC non transfectées. Un phénomène similaire se produit avec l'AR qui augmente la présence de la protéine MyoD dans les MSC-HIF α (Annexe III).

10.6 Conclusion

Pour la première fois nous montrons la différenciation des cellules P19 en adipocytes induite par l'AR. Le phénotype adipocytaire est accompagné de myocytes cardiaques et squelettiques. Les rendements des trois types cellulaires sont influencés par l'utilisation d'analogues de l'AR et sont associés à des différences du taux de phosphorylation des MAPK ERK et P38. Une activation des voies RAR est anti-myogénique et pro-adipogénique sauf dans le cas où cette activation est réalisée tardivement après une induction avec l'OT, soulignant ainsi l'action déterminante d'OT dans la myogénèse. Dans ce dernier cas, l'activation des voies RAR stimulent la squelettomyogénèse. Contrairement à l'activation des voies RAR, celle des voies RXR est permissive pour les trois phénotypes mésodermiques. L'induction des cellules P19 avec la combinaison "OT + l'activateur BCI de ERK + RA_L" a plus que doublé le rendement cardiomyogénique par rapport à OT utilisée seule; des SKM sont aussi présents dans les cultures pour les deux conditions. D'autre part, ERK et P38 sont positivement impliquées dans l'action myogénique d'OT puisque cette action est inhibée par des inhibiteurs de ces kinases. Les petites molécules telles que les rétinoïdes et les modulateurs pharmacologiques des MAPK offrent des outils prometteurs pour la compréhension et le contrôle des mécanismes de différenciation cellulaire. Des rétinoïdes potentiellement morphogéniques pourraient être sélectionnés selon leur capacité à agir sur les MAPK durant la période d'induction de la différenciation. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'intersection des voies de l'AR et des MAPK dans la différenciation mésodermique.

ANNEXE I : IMPACT DES RÉTINOÏDES DANS LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE DES CELLULES P19.

La fenêtre d'induction joue un rôle important dans la différenciation cardiaque à base d'ocytocine (OT). L'ajout d'acide *tout-trans* rétinoïque (atRA) au jour zéro (J0) de la période d'induction avec l'OT inhibe fortement la différenciation myogénique. Par contre, si l'atRA est ajouté seulement au J2, la myogenèse est de nouveau possible et ce sont des SKM qui sont principalement obtenus. Nous avons analysé l'impact de la fenêtre d'induction dans un autre protocole de différenciation, la différenciation neuronale. Ce protocole est décrit dans (Ducharme *et al.* 2010; Laplante *et al.* 2004). Les cellules P19 ont été cultivées en suspension pendant quatre jours pour permettre la formation d'agrégats. L'atRA (ou un autre rétinoïde) a été ajouté au J0 ou au J2 de la période d'induction. Les cellules ont été ensuite individualisées par trypsinisation des agrégats et cultivées en monocouches pendant 48h dans un milieu Neurobasal supplémenté.

L'atRA, le TTNPB (agoniste des RAR) et le LG268 (agoniste des RXR) induisent la différenciation neuronale lorsqu'ils sont ajoutés au J0 de la période d'induction. La présence de neurites (Fig. A.1 A) et de la β III-tubuline (un marqueur neuronal) (Fig. A.1 B) indique la présence de neurones. Le TTNPB induit la différenciation neuronale des cellules P19 dans un rendement similaire à celui de l'atRA; le LG268 est aussi neurogénique mais à un moindre degré (Fig. A1 A et B). Il n'y a pas de génération de neurones lorsque les rétinoïdes sont ajoutés seulement à partir du J2 de la période d'induction. Le protocole adipogénique implique aussi l'ajout de l'atRA seulement à partir du J2. L'analyse de la β III-tubuline dans ce protocole montre peu ou pas d'expression de cette protéine quelque soit le rétinoïde utilisé (Fig. A.1 C).

Références :

Laplante, I., R. Beliveau et J. Paquin. 2004. «RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells». *J Neurobiol.*, vol. 60, no 3, p. 289-307.

Ducharme, P., D. Maltais, D. Desroches, M. A. Mateescu et J. Paquin. 2010. «Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage». *Neuroscience*, vol. 167, no 3, p. 633-643.

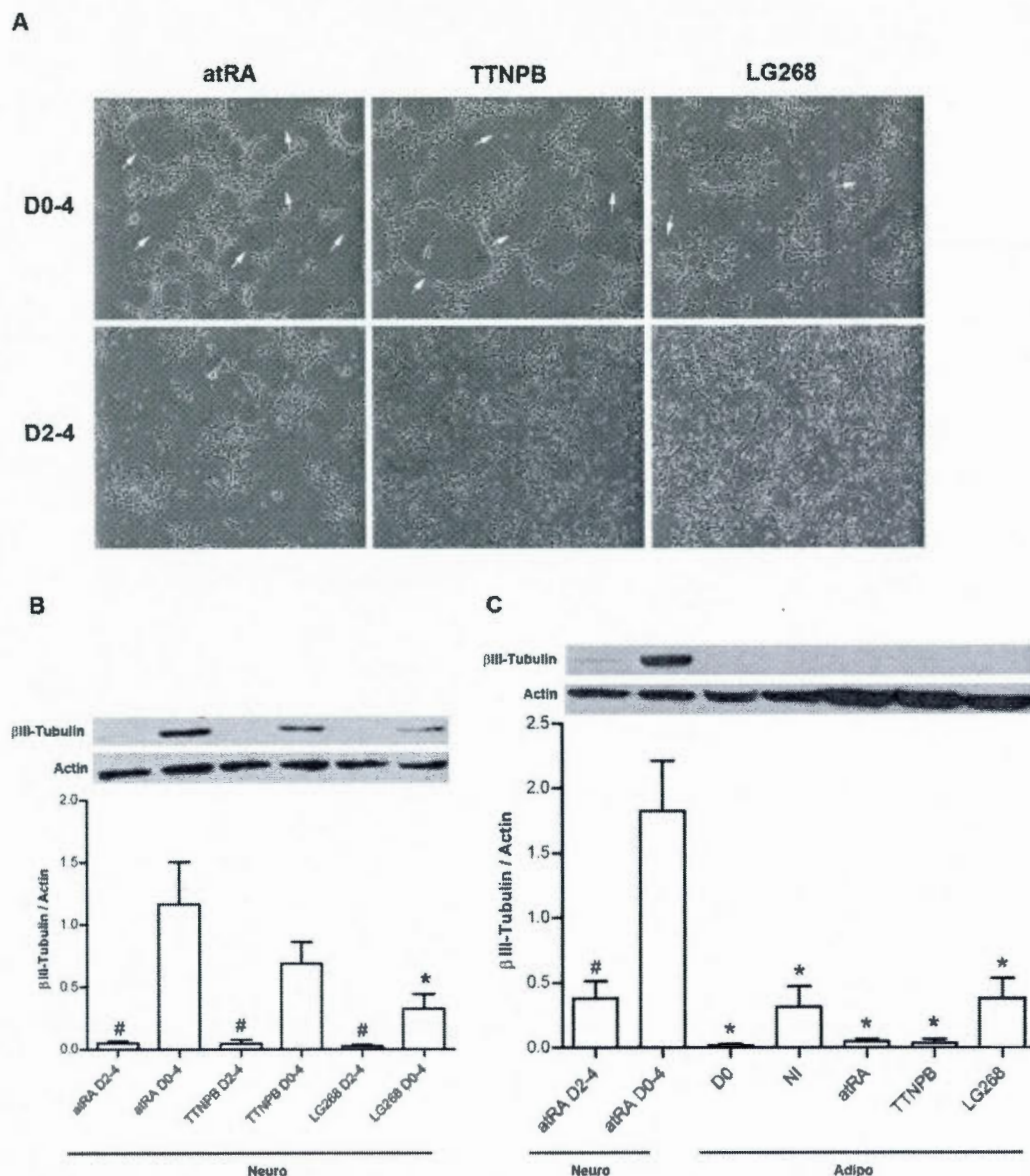


Figure A.1 Importance de la fenêtre d'induction dans la différenciation neuronale. Les cellules P19 ont été différenciées en neurones avec 10^{-6} M d'atRA (TTNPB ou LG268) comme agent inducteur. L'agent inducteur a été présent de J0 à J4 ou de J2 à J4, et les cultures ont été analysées à J6. (A) Micrographies. Les flèches pointent vers des neurites. (B) Immunobuvardage de la β III-tubuline. (C) Le rendement neuronal est comparé entre le protocole neuronal (Neuro) et le protocole adipogénique (Adipo) par immunobuvardage de la β III-tubuline. Le traitement D0-4 est significativement différent du traitement D2-4 correspondant (#), et le traitement indiqué est significativement différent du traitement Neuro/atRA D0-4 (*) ($p < 0,05$).

ANNEXE II : CULTURE DE CELLULES P19 DANS DES EPONGES DE FIBROÏNE DE SOIE

L'intérêt grandissant envers l'ingénierie tissulaire porte les chercheurs à s'intéresser à la culture des cellules dans des matrices en trois dimensions (3D). Ces matrices doivent être de structure poreuse afin de mimer les matrices extracellulaires des organes et permettre la migration, l'adhérence et la prolifération cellulaires. En collaboration avec les équipes des Drs Mircea-Alexandru Mateescu et Isabelle Marcotte (UQAM), des éponges de protéines de soie, préparées par Frédéric Byette, ont été réalisées en variant deux paramètres : la température de congélation et la concentration de NaCl. Des cellules P19 ont été marquées avec le 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE; Sigma, Oakville, ON, Canada) puis déposées au-dessus des éponges pré-équilibrées avec du milieu complet, et mises en culture pour 24h. Les éponges contenant les cellules P19 ont par la suite été incubées avec une solution d'iodure de propidium (IP), avant d'être analysées en microscopie confocale pour apprécier la viabilité cellulaire. Les cellules vivantes ne laissent pas entrer l'IP et exhibent la fluorescence verte du CFSE. Les cellules mortes laissent entrer l'IP et exhibent alors une fluorescence rouge ou jaune dépendamment des quantités de CFSE et d'IP présentes dans la cellule. L'IP colore aussi la fibroïne de l'éponge.

Peu importe la concentration en NaCl et la température de congélation de la fibroïne de soie, les cellules P19 sont viables (Fig. A.2). Pour mesurer la pénétration des cellules dans les éponges nous avons fait de la reconstitution en 3D d'images de microscopie confocale en utilisant un code couleur de la fluorescence du CFSE en fonction de la profondeur (Fig. A.3). Ainsi, la Fig. A.3 montre que les nombreuses cellules vues pour l'éponge -73°C/0 mM NaCl de la Fig. A.2 sont situées à la surface (Fig. A.3 a). Au contraire, le nombre moins grand de cellules observé pour les éponges -22°C/50 mM NaCl et -73°C/50 mM NaCl à la Fig. A.2 s'explique par une colonisation en profondeur (Fig. A.3 b et c). Les cellules P19 ont aussi une tendance à former des agrégats sur les microvilosités retrouvées sur et dans les éponges. Ce résultat est intéressant puisque l'agrégation des cellules de type embryonnaire est importante pour permettre la différenciation en de nombreux types cellulaires comme des myocytes.

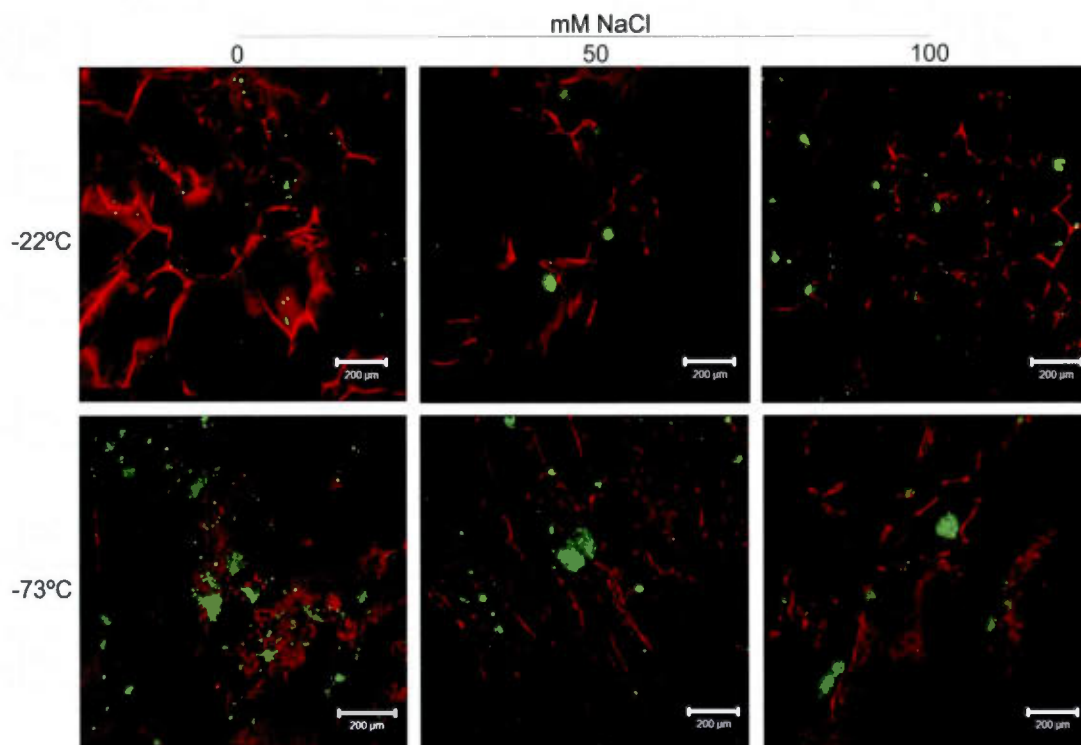


Figure A.2 Images confocales de surface d'éponges de fibroïneensemencées avec des cellules P19. Diverses éponges ont été obtenues en variant la température de congélation et la concentration de NaCl. Des cellules P19 préalablement marquées avec le CFSE ont été déposées à leur surface. Avant l'observation en microscopie confocale, les systèmes cellules-éponges ont été marqués avec l'IP. Cette figure est tirée de l'article de (Byette *et al.*, 2011) dont le résumé est présenté à la page 166.

Référence

Byette, Frédéric, Frédéric Bouchard, Christian Pellerin, Joanne Paquin, Isabelle Marcotte et Mircea Mateescu. 2011. «Cell-culture compatible silk fibroin scaffolds concomitantly patterned by freezing conditions and salt concentration». *Polymer Bulletin*, vol. 67, no 1, p. 159-175.

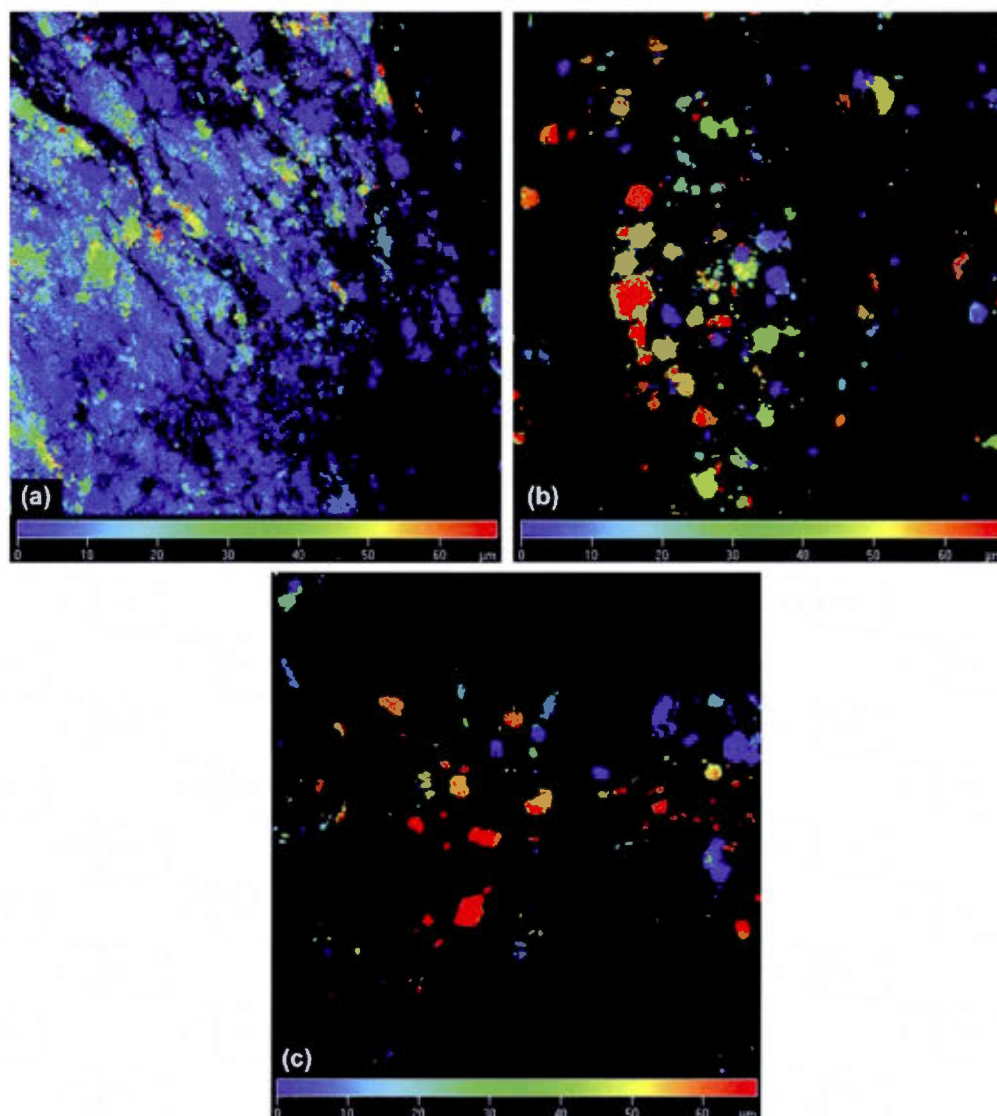


Figure A.3 Reconstruction 3D d'images confocales d'éponges de fibroïne colonisées avec des cellules P19. Les cellules ont été marquées avec le CFSE avant l'ensemencement sur les éponges. La fluorescence du CFSE est montrée selon une échelle de couleur qui indique la profondeur atteinte par les cellules dans l'éponge. Ainsi, le bleu indique des cellules demeurées à la surface. Les éponges montrées sont celles des conditions $-73^{\circ}\text{C}/0\text{ mM NaCl}$ (a), $-73^{\circ}\text{C}/50\text{ mM NaCl}$ (b) et $-22^{\circ}\text{C}/50\text{ mM NaCl}$ (c). Cette figure est tirée de l'article de (Byette *et al.*, 2011) dont le résumé est présenté à la page 166.

Référence

Byette, Frédéric, Frédéric Bouchard, Christian Pellerin, Joanne Paquin, Isabelle Marcotte et Mircea Mateescu. 2011. «Cell-culture compatible silk fibroin scaffolds concomitantly patterned by freezing conditions and salt concentration». *Polymer Bulletin*, vol. 67, no 1, p. 159-175.

Cell-culture compatible silk fibroin scaffolds concomitantly patterned by freezing conditions and salt concentration

Frédéric Byette · Frédéric Bouchard ·
Christian Pellerin · Joanne Paquin ·
Isabelle Marcotte · Mircea A. Mateescu

Received: 17 August 2010 / Revised: 1 December 2010 / Accepted: 30 December 2010 /
Published online: 22 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The morphology of freeze-dried silk fibroin 3D-scaffolds was modified by varying both the NaCl concentration and the freezing temperature of the silk fibroin solution prior to lyophilization. Scanning electron micrographs showed that slow freezing at -22°C generated sponge-like interconnected porous networks, whereas fast freezing at -73°C formed stacked leaflet structures. The presence of millimolar NaCl (50–250 mM) increased the porosity of the scaffolds and generated small outgrowths at their surface, depending on the freezing regime. Our results suggest that the morphological differences seen between the materials likely depend on ice and NaCl hydrate crystal nucleation and growth mechanisms. Infrared spectroscopy and X-ray diffraction analyses revealed that the salt concentration and freezing conditions induced no structural changes in fibroin. The seeding of P19 embryonic carcinoma cells showed that the presence of salt and freezing conditions influenced the cell distribution into the scaffolds, with salt addition increasing the access of cells to deeper regions.

ANNEXE III : IMPACT DE HIF-1 α SUR DES MARQUEURS MYOCYTAIRES ET ADIPOCYTAIRES DANS DES CELLULES MSC.

Des cellules souches adultes sont retrouvées dans plusieurs organes composant le corps. Ces cellules souches permettent le maintien des fonctions de l'organe où elles sont retrouvées et sa régénération le cas échéant. Lorsque ces cellules sont extraites de l'organe (sorties de leur niche), leur spectre de différenciation est souvent limité aux phénotypes cellulaires composant l'organe de leur provenance. Pour cette raison, les chercheurs tentent de recréer *in vitro*, dans les cultures de cellules souches, les conditions qui existent *in vivo*. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse sont naturellement dans des conditions hypoxiques. Des cellules MSC de souris ont été transfectées avec le gène du facteur inductible de l'hypoxie (MSC-HIF) pour recréer l'état cellulaire de réponse à l'hypoxie. Des cellules MSC témoins ont été transfectées avec le même vecteur sans l'insertion du gène de HIF (MSC-AP2). Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Borhane Annabi (UQAM), en particulier avec Sébastien Proulx-Bonneau.

L'analyse de la prolifération cellulaire avec le crystal violet (Fig. A.4 A) montre que les MSC-HIF sont sensibles aux rétinoïdes puisque l'acide *tout-trans* rétinoïque (atRA), l'agoniste des RAR (TTNPB) et l'agoniste des RXR (LG268) diminuent la prolifération cellulaire. Les MSC-HIF montrent aussi une augmentation de l'ARNm et de la protéine des marqueurs myocytaires MyoD (squelettomyogenèse) et cTpnI (cardiomyogenèse) et une diminution de l'ARNm de la lipoprotéine-lipase (LPL, un marqueur adipocytaire) et cela, en absence d'inducteur (Fig A.4 B). L'utilisation de l'ocytocine (OT) comme agent inducteur pendant 24h fait augmenter les niveaux protéiques de la cTpnI dans les cellules MSC-HIF alors que l'atRA fait augmenter ceux du facteur de transcription MyoD (Fig. A.4 C). Les analogues d'atRA n'ont pas eu d'effet sur l'expression des marqueurs.

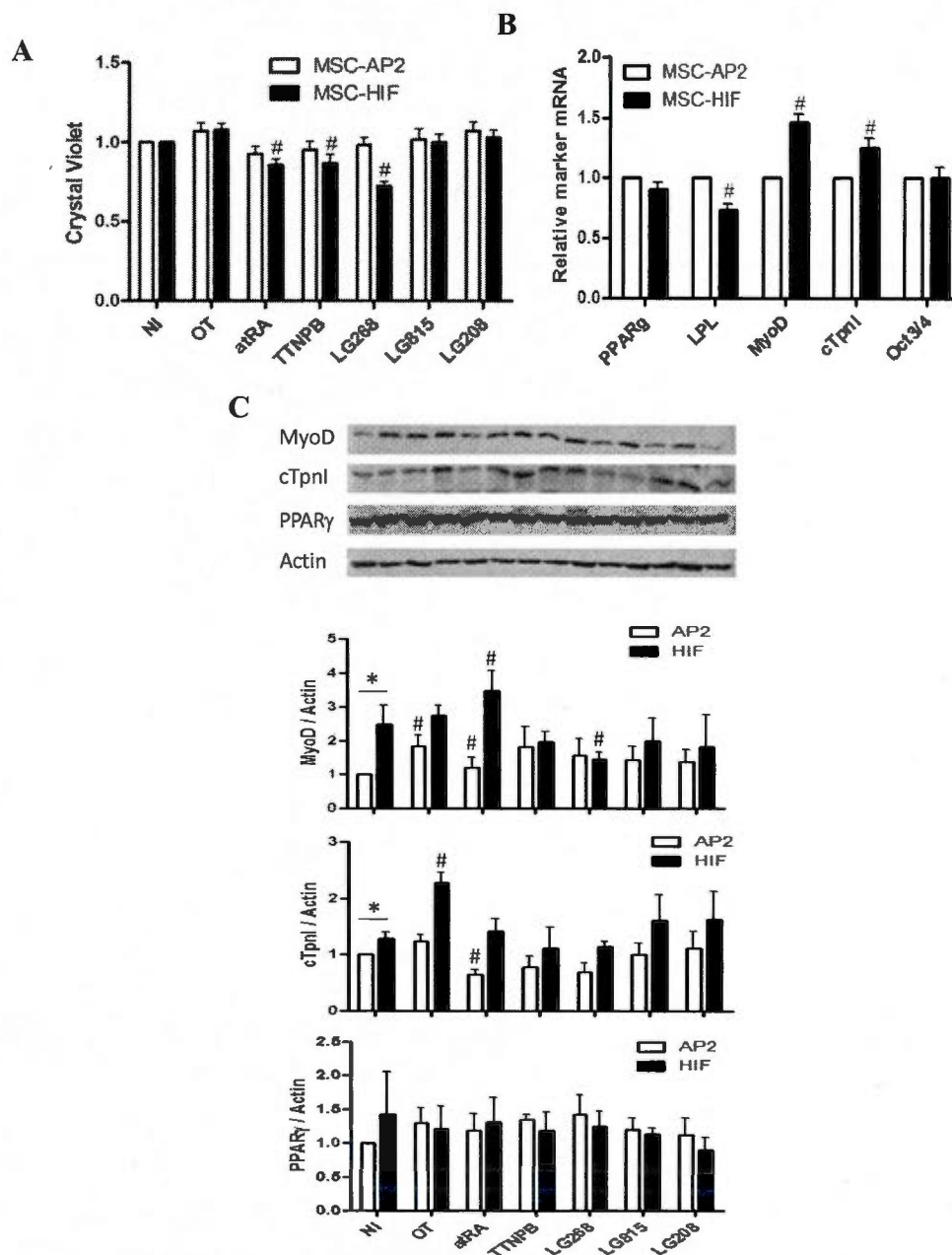


Figure A.4 Impact de l'OT et des rétinoïdes sur des MSC de souris. Des cellules MSC ont été transfectées pour HIF-1 α (MSC-HIF) ou avec un vecteur témoin (MSC-AP2). (A) Analyse de la prolifération cellulaire par coloration avec le crystal violet après que les cellules aient été cultivées pendant 24h en présence d'ocytocine (10^{-7} M OT) et des rétinoïdes (10^{-6} M) atRA, TTNPB (agoniste des RAR), LG268 (agoniste des RXR), LG815 (antagoniste des RAR) et LG208 (antagoniste des RXR). Analyses par (B) qPCR et (C) immunobuvardage de marqueurs myocytaires et adipocytaires. (#) indique une différence significative par rapport à la condition non induite (NI), et (*) la réponse des MSC-HIF est significativement différente de celle des MSC-AP2 pour la même condition ($p < 0,05$).

ANNEXE IV : AUTRE CONTRIBUTION

Biochemical and Biophysical Research Communications 412 (2011) 429–434



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



The NCI-N87 cell line as a gastric epithelial barrier model for drug permeability assay

Marc Lemieux^a, Frédéric Bouchard^a, Patrick Gosselin^b, Joanne Paquin^{a,*}, Mircea Alexandru Mateescu^{a,*}

^a Department of Chemistry–Biochemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada H3C 3P8

^b Corealis Pharma Inc., 200 Boulevard Armand Frappier, Laval (Québec), Canada H7V 4A6

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2011

Available online 29 July 2011

Keywords:

NCI-N87 gastric epithelial barrier

Trans epithelial electrical resistance

Tight junctions

Gastric drug permeation

Apparent permeability coefficient

pH gradient

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the human NCI-N87 cell line as a model for gastric permeability drug studies under pH conditions of the stomach. The optimal conditions that led NCI-N87 cells to form a typical differentiated gastric epithelial barrier were a seeding density of 2.5×10^5 cells/cm² on porous inserts and growth in serum-complemented RPMI-1640 medium until 18–27 days post-confluency. The resulting cell monolayers showed moderately high transepithelial electrical resistance (TEER) values of about $500 \Omega \text{ cm}^2$, cells of polygonal morphology expressing E-cadherin and ZO-1 proteins at their contact surfaces, and production of mucus clusters. The monolayers withstood apical pH of 7.4 down to 3.0 with the basal pH fixed at 7.4. The apparent permeability coefficients (P_{app}) of model compounds were evaluated in the apical-to-basolateral and basolateral-to-apical directions under different pH gradients. The monolayers were impermeable to the integrity marker Lucifer Yellow (low P_{app} of $0.3\text{--}1.1 \times 10^{-6}$ cm/s). The furosemide P_{app} ($0.4\text{--}1.5 \times 10^{-5}$ cm/s) were slightly dependent on pH but remained moderate. The caffeine P_{app} ($4.2\text{--}5.0 \times 10^{-5}$ cm/s) were higher and insensitive to pH changes. The NCI-N87 cell line provides a useful *in vitro* tool to assess gastric drug permeability and absorption under physiologic conditions prevailing in the human stomach.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, D. G., N. A. Sachs et R. R. Vaillancourt. 2002. «Phosphorylation of the stress-activated protein kinase, MEKK3, at serine 166». *Arch Biochem Biophys*, vol. 407, no 1, p. 103-116.
- Adan, R. A., J. J. Cox, T. V. Beischlag et J. P. Burbach. 1993. «A composite hormone response element mediates the transactivation of the rat oxytocin gene by different classes of nuclear hormone receptors». *Mol Endocrinol*, vol. 7, no 1, p. 47-57.
- Adler, S., C. Pellizzer, L. Hareng, T. Hartung et S. Bremer. 2008. «First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells». *Toxicol In Vitro*, vol. 22, no 1, p. 200-211.
- Alsayed, Y., S. Uddin, N. Mahmud, F. Lekmine, D. V. Kalvakolanu, S. Minucci, G. Bokoch et L. C. Platanias. 2001. «Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid». *J Biol Chem*, vol. 276, no 6, p. 4012-4019.
- Altstein, M., et H. Gainer. 1988. «Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development». *J Neurosci*, vol. 8, no 11, p. 3967-3977.
- Altucci, L., M. D. Leibowitz, K. M. Ogilvie, A. R. de Lera et H. Gronemeyer. 2007. «RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 6, no 10, p. 793-810.
- Alvarez, R., M. Checa, S. Brun, O. Vinas, T. Mampel, R. Iglesias, M. Giralt et F. Villarroya. 2000. «Both retinoic-acid-receptor- and retinoid-X-receptor-dependent signalling pathways mediate the induction of the brown-adipose-tissue-uncoupling-protein-1 gene by retinoids». *Biochem J*, vol. 345 Pt 1, p. 91-97.
- Anderson, J. E., L. M. McIntosh, A. N. Moor et Z. Yablonka-Reuveni. 1998. «Levels of MyoD protein expression following injury of mdx and normal limb muscle are modified by thyroid hormone». *J Histochem Cytochem*, vol. 46, no 1, p. 59-67.
- Andrews, P. W., M. M. Matin, A. R. Bahrami, I. Damjanov, P. Gokhale et J. S. Draper. 2005. «Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin». *Biochem Soc Trans*, vol. 33, no Pt 6, p. 1526-1530.
- Ang, V. T., et J. S. Jenkins. 1984. «Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla». *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 58, no 4, p. 688-691.
- Anghileri, E., S. Marconi, A. Pignatelli, P. Cifelli, M. Galie, A. Sbarbati, M. Krampera, O. Belluzzi et B. Bonetti. 2008. «Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells». *Stem Cells Dev*, vol. 17, no 5, p. 909-916.

- Anversa, P., et B. Nadal-Ginard. 2002. «Myocyte renewal and ventricular remodelling». *Nature*, vol. 415, no 6868, p. 240-243.
- Aouadi, M., B. Binetruy, L. Caron, Y. Le Marchand-Brustel et F. Bost. 2006a. «Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice». *Biochimie*, vol. 88, no 9, p. 1091-1098.
- Aouadi, M., F. Bost, L. Caron, K. Laurent, Y. Le Marchand Brustel et B. Binetruy. 2006b. «p38 mitogen-activated protein kinase activity commits embryonic stem cells to either neurogenesis or cardiomyogenesis». *Stem Cells*, vol. 24, no 5, p. 1399-1406.
- Aouadi, M., J. Jager, K. Laurent, T. Gonzalez, M. Cormont, B. Binetruy, Y. Le Marchand-Brustel, J. F. Tanti et F. Bost. 2007. «p38MAP Kinase activity is required for human primary adipocyte differentiation». *FEBS Lett*, vol. 581, no 29, p. 5591-5596.
- Aouadi, M., K. Laurent, M. Prot, Y. Le Marchand-Brustel, B. Binetruy et F. Bost. 2006c. «Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages». *Diabetes*, vol. 55, no 2, p. 281-289.
- Argiolas, A., M. R. Melis, R. Stancampiano, A. Mauri et G. L. Gessa. 1990. «Hypothalamic modulation of immunoreactive oxytocin in the rat thymus». *Peptides*, vol. 11, no 3, p. 539-543.
- Ausoni, S., M. Campione, A. Picard, P. Moretti, M. Vitadello, C. De Nardi et S. Schiaffino. 1994. «Structure and regulation of the mouse cardiac troponin I gene». *J Biol Chem*, vol. 269, no 1, p. 339-346.
- Aziz, A., Q. C. Liu et F. J. Dilworth. 2010. «Regulating a master regulator: establishing tissue-specific gene expression in skeletal muscle». *Epigenetics*, vol. 5, no 8, p. 691-695.
- Baksh, D., L. Song et R. S. Tuan. 2004. «Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy». *J Cell Mol Med*, vol. 8, no 3, p. 301-316.
- Bani-Yaghoub, M., S. E. Kendall, D. P. Moore, S. Bellum, R. A. Cowling, G. N. Nikopoulos, C. J. Kubu, C. Vary et J. M. Verdi. 2004. «Insulin acts as a myogenic differentiation signal for neural stem cells with multilineage differentiation potential». *Development*, vol. 131, no 17, p. 4287-4298.
- Baraniak, P. R., et T. C. McDevitt. 2010. «Stem cell paracrine actions and tissue regeneration». *Regen Med*, vol. 5, no 1, p. 121-143.
- Barruet, E., O. Hadadeh, F. Peiretti, V. M. Renault, Y. Hadjal, D. Bernot, R. Tournaire, D. Negre, I. Juhan-Vague, M. C. Alessi et B. Binetruy. 2011. «p38 mitogen activated

- protein kinase controls two successive-steps during the early mesodermal commitment of embryonic stem cells». *Stem Cells Dev*, vol. 20, no 7, p. 1233-1246.
- Barua, A. B., et H. C. Furr. 1998. «Properties of retinoids. Structure, handling, and preparation». *Mol Biotechnol*, vol. 10, no 2, p. 167-182.
- Behfar, A., L. V. Zingman, D. M. Hodgson, J. M. Rauzier, G. C. Kane, A. Terzic et M. Puceat. 2002. «Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart». *FASEB J*, vol. 16, no 12, p. 1558-1566.
- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, B. Nadal-Ginard et P. Anversa. 2003. «Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration». *Cell*, vol. 114, no 6, p. 763-776.
- Binetruy, B., L. Heasley, F. Bost, L. Caron et M. Aouadi. 2007. «Concise review: regulation of embryonic stem cell lineage commitment by mitogen-activated protein kinases». *Stem Cells*, vol. 25, no 5, p. 1090-1095.
- Boehm, M. F., L. Zhang, B. A. Badea, S. K. White, D. E. Mais, E. Berger, C. M. Suto, M. E. Goldman et R. A. Heyman. 1994. «Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids». *J Med Chem*, vol. 37, no 18, p. 2930-2941.
- Boehm, M. F., L. Zhang, L. Zhi, M. R. McClurg, E. Berger, M. Wagoner, D. E. Mais, C. M. Suto, J. A. Davies, R. A. Heyman et al. 1995. «Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells». *J Med Chem*, vol. 38, no 16, p. 3146-3155.
- Bost, F., M. Aouadi, L. Caron et B. Binetruy. 2005a. «The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity». *Biochimie*, vol. 87, no 1, p. 51-56.
- Bost, F., M. Aouadi, L. Caron, P. Even, N. Belmonte, M. Prot, C. Dani, P. Hofman, G. Pages, J. Pouyssegur, Y. Le Marchand-Brustel et B. Binetruy. 2005b. «The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis». *Diabetes*, vol. 54, no 2, p. 402-411.
- Bost, F., L. Caron, I. Marchetti, C. Dani, Y. Le Marchand-Brustel et B. Binetruy. 2002. «Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage». *Biochem J*, vol. 361, no Pt 3, p. 621-627.
- Bouchard, F., et J. Paquin. 2009. «Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells». *Stem Cells Dev*, vol. 18, no 7, p. 1023-1032.
- Boudjelal, M., R. Taneja, S. Matsubara, P. Bouillet, P. Dolle et P. Chambon. 1997. «Overexpression of Stral3, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-

- loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells». *Genes Dev*, vol. 11, no 16, p. 2052-2065.
- Brandebourg, T. D., et C. Y. Hu. 2005. «Regulation of differentiating pig preadipocytes by retinoic acid». *J Anim Sci*, vol. 83, no 1, p. 98-107.
- Brtko, J. 2007. «Retinoids, rexinoids and their cognate nuclear receptors: character and their role in chemoprevention of selected malignant diseases». *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, vol. 151, no 2, p. 187-194.
- Bruck, N., D. Vitoux, C. Ferry, V. Duong, A. Bauer, H. de The et C. Rochette-Egly. 2009. «A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters». *Embo J*, vol. 28, no 1, p. 34-47.
- Burgermeister, E., D. Chuderland, T. Hanoch, M. Meyer, M. Liscovitch et R. Seger. 2007. «Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma». *Mol Cell Biol*, vol. 27, no 3, p. 803-817.
- Burgermeister, E., et R. Seger. 2007. «MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma». *Cell Cycle*, vol. 6, no 13, p. 1539-1548.
- Burt, R. K., Y. Loh, W. Pearce, N. Beohar, W. G. Barr, R. Craig, Y. Wen, J. A. Rapp et J. Kessler. 2008. «Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases». *JAMA*, vol. 299, no 8, p. 925-936.
- Buttery, L. D., S. Bourne, J. D. Xynos, H. Wood, F. J. Hughes, S. P. Hughes, V. Episkopou et J. M. Polak. 2001. «Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells». *Tissue Eng*, vol. 7, no 1, p. 89-99.
- Byette, Frédéric, Frédéric Bouchard, Christian Pellerin, Joanne Paquin, Isabelle Marcotte et Mircea Mateescu. 2011. «Cell-culture compatible silk fibroin scaffolds concomitantly patterned by freezing conditions and salt concentration». *Polymer Bulletin*, vol. 67, no 1, p. 159-175.
- Cai, J., Y. Zhao, Y. Liu, F. Ye, Z. Song, H. Qin, S. Meng, Y. Chen, R. Zhou, X. Song, Y. Guo, M. Ding et H. Deng. 2007. «Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells». *Hepatology*, vol. 45, no 5, p. 1229-1239.
- Canada, Santé. 2008. «Maladies du coeur/Maladies cardiovasculaires». En ligne. <<http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/dc-ma/heart-coeur-fra.php>>. Consulté le 2011-11-15.
- Carr, A. J., A. A. Vugler, S. T. Hikita, J. M. Lawrence, C. Gias, L. L. Chen, D. E. Buchholz, A. Ahmado, M. Semo, M. J. Smart, S. Hasan, L. da Cruz, L. V. Johnson, D. O. Clegg et P. J. Coffey. 2009. «Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat». *PLoS One*, vol. 4, no 12, p. e8152.

- Caspi, O., I. Huber, I. Kehat, M. Habib, G. Arbel, A. Gepstein, L. Yankelson, D. Aronson, R. Beyar et L. Gepstein. 2007. «Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts». *J Am Coll Cardiol*, vol. 50, no 19, p. 1884-1893.
- Chambon, P. 1996. «A decade of molecular biology of retinoic acid receptors». *FASEB J*, vol. 10, no 9, p. 940-954.
- Chard, T., N. R. Boyd, M. L. Forsling, A. S. McNeilly et J. Landon. 1970. «The development of a radioimmunoassay for oxytocin: the extraction of oxytocin from plasma, and its measurement during parturition in human and goat blood». *J Endocrinol*, vol. 48, no 2, p. 223-234.
- Chen, K., L. Wu et Z. Z. Wang. 2008. «Extrinsic regulation of cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells». *J Cell Biochem*, vol. 104, no 1, p. 119-128.
- Chen, S. L., W. W. Fang, F. Ye, Y. H. Liu, J. Qian, S. J. Shan, J. J. Zhang, R. Z. Chunhua, L. M. Liao, S. Lin et J. P. Sun. 2004. «Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction». *Am J Cardiol*, vol. 94, no 1, p. 92-95.
- Chen, Y., M. Dokmanovic, W. D. Stein, R. J. Ardecky et I. B. Roninson. 2006. «Agonist and antagonist of retinoic acid receptors cause similar changes in gene expression and induce senescence-like growth arrest in MCF-7 breast carcinoma cells». *Cancer Res*, vol. 66, no 17, p. 8749-8761.
- Cho, K. J., K. A. Trzaska, S. J. Greco, J. McArdle, F. S. Wang, J. H. Ye et P. Rameshwar. 2005. «Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha». *Stem Cells*, vol. 23, no 3, p. 383-391.
- Choi, S. C., J. Yoon, W. J. Shim, Y. M. Ro et D. S. Lim. 2004. «5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells». *Exp Mol Med*, vol. 36, no 6, p. 515-523.
- Christoforou, N., et J. D. Gearhart. 2007. «Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies». *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 49, no 6, p. 396-413.
- Clabby, M. L., T. A. Robison, H. F. Quigley, D. B. Wilson et D. P. Kelly. 2003. «Retinoid X receptor alpha represses GATA-4-mediated transcription via a retinoid-dependent interaction with the cardiac-enriched repressor FOG-2». *J Biol Chem*, vol. 278, no 8, p. 5760-5767.
- Cochard, Larry R., et Frank H. Netter. 2003. *Atlas d'embryologie humaine de Netter*. Paris: Masson, xvii, 263 p.

- Craig, E. A., M. V. Stevens, R. R. Vaillancourt et T. D. Camenisch. 2008. «MAP3Ks as central regulators of cell fate during development». *Dev Dyn*, vol. 237, no 11, p. 3102-3114.
- Crettaz, M., A. Baron, G. Siegenthaler et W. Hunziker. 1990. «Ligand specificities of recombinant retinoic acid receptors RAR alpha and RAR beta». *Biochem J*, vol. 272, no 2, p. 391-397.
- Dai, W., L. J. Field, M. Rubart, S. Reuter, S. L. Hale, R. Zweigerdt, R. E. Graichen, G. L. Kay, A. J. Jyrala, A. Colman, B. P. Davidson, M. Pera et R. A. Kloner. 2007. «Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts». *J Mol Cell Cardiol*, vol. 43, no 4, p. 504-516.
- Danalache, B. A., J. Gutkowska, M. J. Slusarz, I. Berezowska et M. Jankowski. 2010. «Oxytocin-Gly-Lys-Arg: a novel cardiomyogenic peptide». *PLoS One*, vol. 5, no 10, p. e13643.
- Danalache, B. A., J. Paquin, W. Donghao, R. Grygorczyk, J. C. Moore, C. L. Mummery, J. Gutkowska et M. Jankowski. 2007. «Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis». *Stem Cells*, vol. 25, no 3, p. 679-688.
- Dani, C. 1999. «Embryonic stem cell-derived adipogenesis». *Cells Tissues Organs*, vol. 165, no 3-4, p. 173-180.
- Dani, C., A. G. Smith, S. Dessolin, P. Leroy, L. Staccini, P. Villageois, C. Darimont et G. Ailhaud. 1997. «Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro». *J Cell Sci*, vol. 110 (Pt 11), p. 1279-1285.
- Datta, P. K., et E. A. Lianos. 1999. «Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells». *Kidney Int*, vol. 56, no 2, p. 486-493.
- Davidson, S. M., et M. Morange. 2000. «Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes». *Dev Biol*, vol. 218, no 2, p. 146-160.
- de Geest, K., M. Thiery, G. Piron-Possuyt et R. Vanden Driessche. 1985. «Plasma oxytocin in human pregnancy and parturition». *J Perinat Med*, vol. 13, no 1, p. 3-13.
- de la Garza-Rodea, A. S., L. van der Velde-van Dijke, H. Boersma, M. A. Goncalves, D. W. van Bekkum, A. A. de Vries et S. Knaan-Shanzer. 2011. «Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources». *Cell Transplant*.
- den Hertog, C. E., A. N. de Groot et P. W. van Dongen. 2001. «History and use of oxytocics». *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 94, no 1, p. 8-12.

- Devost, D., P. Wrzal et H. H. Zingg. 2008. «Oxytocin receptor signalling». *Prog Brain Res*, vol. 170, p. 167-176.
- Dimmeler, S., et A. M. Zeiher. 2009. «Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions». *Cardiology*, vol. 113, no 3, p. 155-160.
- Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, K. K. Niakan, L. M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, C. E. Henderson et K. Eggan. 2008. «Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons». *Science*, vol. 321, no 5893, p. 1218-1221.
- Dogterom, J., T. B. Van Wimersma Greidanus et D. F. Swabb. 1977. «Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats». *Neuroendocrinology*, vol. 24, no 2, p. 108-118.
- Dolle, P., E. Ruberte, P. Kastner, M. Petkovich, C. M. Stoner, L. J. Gudas et P. Chambon. 1989. «Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse». *Nature*, vol. 342, no 6250, p. 702-705.
- Dorey, K., et E. Amaya. 2010. «FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis». *Development*, vol. 137, no 22, p. 3731-3742.
- Doronzio, G., M. Viretto, I. Russo, L. Mattiello, L. Di Martino, F. Cavalot, G. Anfossi et M. Trovati. 2011. «Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signalling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells: influence of insulin resistance and oxidative stress». *Atherosclerosis*, vol. 216, no 1, p. 44-53.
- Drysdale, T. A., K. D. Patterson, M. Saha et P. A. Krieg. 1997. «Retinoic acid can block differentiation of the myocardium after heart specification». *Dev Biol*, vol. 188, no 2, p. 205-215.
- Du Vigneaud, V., C. Ressler et S. Trippett. 1953. «The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin». *J Biol Chem*, vol. 205, no 2, p. 949-957.
- Ducharme, P., D. Maltais, D. Desroches, M. A. Mateescu et J. Paquin. 2010. «Cerulein-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage». *Neuroscience*, vol. 167, no 3, p. 633-643.
- Duester, G. 2008. «Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis». *Cell*, vol. 134, no 6, p. 921-931.

- Dupin, E., G. W. Calloni et N. M. Le Douarin. 2010. «The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities». *Cell Cycle*, vol. 9, no 2, p. 238-249.
- Eichele, G., C. Tickle et B. M. Alberts. 1985. «Studies on the mechanism of retinoid-induced pattern duplications in the early chick limb bud: temporal and spatial aspects». *J Cell Biol*, vol. 101, no 5 Pt 1, p. 1913-1920.
- Elabd, C., A. Basillais, H. Beaupied, V. Breuil, N. Wagner, M. Scheideler, L. E. Zaragosi, F. Massiera, E. Lemichez, Z. Trajanoski, G. Carle, L. Euller-Ziegler, G. Ailhaud, C. L. Benhamou, C. Dani et E. Z. Amri. 2008. «Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis». *Stem Cells*, vol. 26, no 9, p. 2399-2407.
- Enarsson, M., A. Erlandsson, H. Larsson et K. Forsberg-Nilsson. 2002. «Extracellular signal-regulated protein kinase signaling is uncoupled from initial differentiation of central nervous system stem cells to neurons». *Mol Cancer Res*, vol. 1, no 2, p. 147-154.
- Eriksson, M., et S. Leppa. 2002. «Mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 are required for proliferation and cardiomyocyte differentiation of P19 embryonal carcinoma cells». *J Biol Chem*, vol. 277, no 18, p. 15992-16001.
- Fabian, E., F. Havranek, A. Stork et J. Sponarova. 1969. «[Changes of some indicators of lipid metabolism following short term administration of Biogest to fertile non-pregnant women and in the 1st trimester of pregnancy]». *Cas Lek Cesk*, vol. 108, no 49, p. 1466-1469.
- Favaretto, A. L., G. O. Ballejo, W. I. Albuquerque-Araujo, J. Gutkowska, J. Antunes-Rodrigues et S. M. McCann. 1997. «Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action». *Peptides*, vol. 18, no 9, p. 1377-1381.
- Favreau, C., E. Delbarre, J. C. Courvalin et B. Buendia. 2008. «Differentiation of C2C12 myoblasts expressing lamin A mutated at a site responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy is improved by inhibition of the MEK-ERK pathway and stimulation of the PI3-kinase pathway». *Exp Cell Res*, vol. 314, no 6, p. 1392-1405.
- Foltz, I. N., J. C. Lee, P. R. Young et J. W. Schrader. 1997. «Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway». *J Biol Chem*, vol. 272, no 6, p. 3296-3301.
- Franquinet, Raphaël, et Jean Foucrier. 2003. *Embryologie descriptive*, 2e éd. Paris: Dunod, 157 p.

- Freund, C., D. Ward-van Oostwaard, J. Monshouwer-Kloots, S. van den Brink, M. van Rooijen, X. Xu, R. Zweigerdt, C. Mummery et R. Passier. 2008. «Insulin redirects differentiation from cardiogenic mesoderm and endoderm to neuroectoderm in differentiating human embryonic stem cells». *Stem Cells*, vol. 26, no 3, p. 724-733.
- Fuchs, A. R., F. Fuchs, P. Husslein et M. S. Soloff. 1984. «Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition». *Am J Obstet Gynecol*, vol. 150, no 6, p. 734-741.
- Fujita, T., S. Furukawa, K. Morita, T. Ishihara, M. Shiotani, Y. Matsushita, M. Matsuda et I. Shimomura. 2005. «Glucosamine induces lipid accumulation and adipogenic change in C2C12 myoblasts». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 328, no 2, p. 369-374.
- Garry, D. J., et E. N. Olson. 2006. «A common progenitor at the heart of development». *Cell*, vol. 127, no 6, p. 1101-1104.
- Gassanov, N., F. Er, N. Zagidullin et U. C. Hoppe. 2004. «Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype». *Faseb J*, vol. 18, no 14, p. 1710-1712.
- Gauquelin, G., C. Gharib, F. Ghaemmaghami, A. M. Allevard, F. Cherbal, G. Geelen, F. Bouzeghrane et J. J. Legros. 1988. «A day/night rhythm of vasopressin and oxytocin in rat retina, pineal and harderian gland». *Peptides*, vol. 9, no 2, p. 289-293.
- Geest, C. R., et P. J. Coffey. 2009. «MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis». *J Leukoc Biol*, vol. 86, no 2, p. 237-250.
- Gilbert, Scott F., et Susan R. Singer. 2004. *Biologie du développement*, 2e éd. Bruxelles: De Boeck, xviii, 836 p.
- Gillespie, M. A., F. Le Grand, A. Scime, S. Kuang, J. von Maltzahn, V. Seale, A. Cuenda, J. A. Ranish et M. A. Rudnicki. 2009. «p38- γ -dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program». *J Cell Biol*, vol. 187, no 7, p. 991-1005.
- Gimpl, G., et F. Fahrenholz. 2001. «The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation». *Physiol Rev*, vol. 81, no 2, p. 629-683.
- Gorza, L., S. Ausoni, N. Merciai, K. E. Hastings et S. Schiaffino. 1993. «Regional differences in troponin I isoform switching during rat heart development». *Dev Biol*, vol. 156, no 1, p. 253-264.
- Graichen, R., X. Xu, S. R. Braam, T. Balakrishnan, S. Norfiza, S. Sieh, S. Y. Soo, S. C. Tham, C. Mummery, A. Colman, R. Zweigerdt et B. P. Davidson. 2008. «Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK». *Differentiation*, vol. 76, no 4, p. 357-370.

- Grayson, W. L., F. Zhao, B. Bunnell et T. Ma. 2007. «Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 358, no 3, p. 948-953.
- Greco, S. J., et P. Rameshwar. 2007. «Enhancing effect of IL-1alpha on neurogenesis from adult human mesenchymal stem cells: implication for inflammatory mediators in regenerative medicine». *J Immunol*, vol. 179, no 5, p. 3342-3350.
- Guan, K., et G. Hasenfuss. 2007. «Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes?». *J Mol Cell Cardiol*, vol. 43, no 4, p. 377-387.
- Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard et R. J. Davis. 1996. «Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors». *Embo J*, vol. 15, no 11, p. 2760-2770.
- Gutkowska, J., M. Jankowski, C. Lambert, S. Mukaddam-Daher, H. H. Zingg et S. M. McCann. 1997. «Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no 21, p. 11704-11709.
- Gutkowska, J., M. Jankowski, S. Mukaddam-Daher et S. M. McCann. 2000. «Oxytocin is a cardiovascular hormone». *Braz J Med Biol Res*, vol. 33, no 6, p. 625-633.
- Hammock, E. A., et L. J. Young. 2006. «Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 361, no 1476, p. 2187-2198.
- Hare, J. M., J. H. Traverse, T. D. Henry, N. Dib, R. K. Strumpf, S. P. Schulman, G. Gerstenblith, A. N. DeMaria, A. E. Denktas, R. S. Gammon, J. B. Hermiller, Jr., M. A. Reisman, G. L. Schaer et W. Sherman. 2009. «A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction». *J Am Coll Cardiol*, vol. 54, no 24, p. 2277-2286.
- Harmancey, R., J. M. Senard, A. Pathak, F. Desmoulin, C. Claparols, P. Rouet et F. Smih. 2005. «The vasoactive peptide adrenomedullin is secreted by adipocytes and inhibits lipolysis through NO-mediated beta-adrenergic agonist oxidation». *FASEB J*, vol. 19, no 8, p. 1045-1047.
- Hatami, L., M. R. Valojerdi et S. J. Mowla. 2007. «Effects of oxytocin on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells». *Int J Cardiol*, vol. 117, no 1, p. 80-89.

- Heidenreich, K. A., et J. L. Kummer. 1996. «Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons». *J Biol Chem*, vol. 271, no 17, p. 9891-9894.
- Heidenreich, O., A. Neininger, G. Schratt, R. Zinck, M. A. Cahill, K. Engel, A. Kotlyarov, R. Kraft, S. Kostka, M. Gaestel et A. Nordheim. 1999. «MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo». *J Biol Chem*, vol. 274, no 20, p. 14434-14443.
- Hillel, A. T., S. Varghese, J. Petsche, M. J. Shamblott et J. H. Elisseeff. 2009. «Embryonic germ cells are capable of adipogenic differentiation in vitro and in vivo». *Tissue Eng Part A*, vol. 15, no 3, p. 479-486.
- Hollander, E., S. Novotny, M. Hanratty, R. Yaffe, C. M. DeCaria, B. R. Aronowitz et S. Mosovich. 2003. «Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders». *Neuropsychopharmacology*, vol. 28, no 1, p. 193-198.
- Honda, M., T. S. Hamazaki, S. Komazaki, H. Kagechika, K. Shudo et M. Asashima. 2005. «RXR agonist enhances the differentiation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells in serum-free conditions». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 333, no 4, p. 1334-1340.
- Hosoda, T., M. Rota, J. Kajstura, A. Leri et P. Anversa. 2011. «Role of stem cells in cardiovascular biology». *J Thromb Haemost*, vol. 9 Suppl 1, p. 151-161.
- in 't Anker, P. S., W. A. Noort, S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, A. B. Kruisselbrink, R. L. van Bezooijen, W. Beekhuizen, R. Willemze, H. H. Kanhai et W. E. Fibbe. 2003. «Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential». *Haematologica*, vol. 88, no 8, p. 845-852.
- Indrawattana, N., G. Chen, M. Tadokoro, L. H. Shann, H. Ohgushi, T. Tateishi, J. Tanaka et A. Bunyaratvej. 2004. «Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 320, no 3, p. 914-919.
- Insel, T. R. 1997. «A neurobiological basis of social attachment». *Am J Psychiatry*, vol. 154, no 6, p. 726-735.
- Jankowski, M., B. Danalache, D. Wang, P. Bhat, F. Hajjar, M. Marcinkiewicz, J. Paquin, S. M. McCann et J. Gutkowska. 2004. «Oxytocin in cardiac ontogeny». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no 35, p. 13074-13079.

- Jankowski, M., F. Hajjar, S. A. Kawas, S. Mukaddam-Daher, G. Hoffman, S. M. McCann et J. Gutkowska. 1998. «Rat heart: a site of oxytocin production and action». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 24, p. 14558-14563.
- Jin, M. S., S. Shi, Y. Zhang, Y. Yan, X. D. Sun, W. Liu et H. W. Liu. 2010. «Icariin-mediated differentiation of mouse adipose-derived stem cells into cardiomyocytes». *Mol Cell Biochem*, vol. 344, no 1-2, p. 1-9.
- Jung, K. M., K. S. Park, J. H. Oh, S. Y. Jung, K. H. Yang, Y. S. Song, D. J. Son, Y. H. Park, Y. P. Yun, M. K. Lee, K. W. Oh et J. T. Hong. 2003. «Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 during the promotion of neurite extension of PC-12 cells by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2». *Mol Pharmacol*, vol. 63, no 3, p. 607-616.
- Kanno, S., P. K. Kim, K. Sallam, J. Lei, T. R. Billiar et L. L. Shears, 2nd. 2004. «Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no 33, p. 12277-12281.
- Kastner, P., M. Mark, N. Ghyselinck, W. Krezel, V. Dupe, J. M. Grondona et P. Chambon. 1997a. «Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development». *Development*, vol. 124, no 2, p. 313-326.
- Kastner, P., N. Messaddeq, M. Mark, O. Wendling, J. M. Grondona, S. Ward, N. Ghyselinck et P. Chambon. 1997b. «Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes». *Development*, vol. 124, no 23, p. 4749-4758.
- Kawai, T., T. Takahashi, M. Esaki, H. Ushikoshi, S. Nagano, H. Fujiwara et K. Kosai. 2004. «Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2». *Circ J*, vol. 68, no 7, p. 691-702.
- Kawamura, T., K. Ono, T. Morimoto, H. Wada, M. Hirai, K. Hidaka, T. Morisaki, T. Heike, T. Nakahata, T. Kita et K. Hasegawa. 2005. «Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes». *J Biol Chem*, vol. 280, no 20, p. 19682-19688.
- Kawazoe, S., N. Ikeda, K. Miki, M. Shibuya, K. Morikawa, S. Nakano, M. Oshimura, I. Hisatome et Y. Shirayoshi. 2009. «Extrinsic factors derived from mouse embryonal carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway». *Dev Growth Differ*, vol. 51, no 2, p. 81-93.
- Kempf, H., M. Lecina, S. Ting, R. Zweigerdt et S. Oh. 2011. «Distinct regulation of mitogen-activated protein kinase activities is coupled with enhanced cardiac differentiation of human embryonic stem cells». *Stem Cell Res*, vol. 7, no 3, p. 198-209.

- Kennedy, K. A., T. Porter, V. Mehta, S. D. Ryan, F. Price, V. Peshdary, C. Karamboulas, J. Savage, T. A. Drysdale, S. C. Li, S. A. Bennett et I. S. Skerjanc. 2009. «Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin». *BMC Biol*, vol. 7, p. 67.
- Keren, A., Y. Tamir et E. Bengal. 2006. «The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development». *Mol Cell Endocrinol*, vol. 252, no 1-2, p. 224-230.
- Kiess, W., S. Petzold, M. Topfer, A. Garten, S. Bluher, T. Kapellen, A. Korner et J. Kratzsch. 2008. «Adipocytes and adipose tissue». *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, vol. 22, no 1, p. 135-153.
- Klimanskaya, I., J. Hipp, K. A. Rezai, M. West, A. Atala et R. Lanza. 2004. «Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics». *Cloning Stem Cells*, vol. 6, no 3, p. 217-245.
- Kook, S. H., H. J. Lee, W. T. Chung, I. H. Hwang, S. A. Lee, B. S. Kim et J. C. Lee. 2008. «Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK». *Mol Cells*, vol. 25, no 4, p. 479-486.
- Krook, H., A. Hagberg, Z. Song, U. Landegren, L. Wennberg et O. Korsgren. 2002. «A distinct Th1 immune response precedes the described Th2 response in islet xenograft rejection». *Diabetes*, vol. 51, no 1, p. 79-86.
- Kroon, E., L. A. Martinson, K. Kadoya, A. G. Bang, O. G. Kelly, S. Eliazar, H. Young, M. Richardson, N. G. Smart, J. Cunningham, A. D. Agulnick, K. A. D'Amour, M. K. Carpenter et E. E. Baetge. 2008. «Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo». *Nat Biotechnol*, vol. 26, no 4, p. 443-452.
- Kuang, S., et M. A. Rudnicki. 2008. «The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential». *Trends Mol Med*, vol. 14, no 2, p. 82-91.
- Kwarta, R. F., Jr., C. A. Kimmel, G. L. Kimmel et W. Slikker, Jr. 1985. «Identification of the cellular retinoic acid binding protein (cRABP) within the embryonic mouse (CD-1) limb bud». *Teratology*, vol. 32, no 1, p. 103-111.
- Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch et J. R. Woodgett. 1994. «The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases». *Nature*, vol. 369, no 6476, p. 156-160.

- Laflamme, M. A., et C. E. Murry. 2005. «Regenerating the heart». *Nat Biotechnol*, vol. 23, no 7, p. 845-856.
- . 2011. «Heart regeneration». *Nature*, vol. 473, no 7347, p. 326-335.
- Lagace, D. C., et M. W. Nachtigal. 2004. «Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis». *J Biol Chem*, vol. 279, no 18, p. 18851-18860.
- Lamblin, M., B. Dabbas, R. Spingarn, R. Mendoza-Sanchez, T. T. Wang, B. S. An, D. C. Huang, R. Kremer, J. H. White et J. L. Gleason. 2010. «Vitamin D receptor agonist/histone deacetylase inhibitor molecular hybrids». *Bioorg Med Chem*, vol. 18, no 11, p. 4119-4137.
- Lanvers, C., G. Hempel, G. Blaschke et J. Boos. 1996. «Simultaneous determination of all-trans-, 13-cis- and 9-cis-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-trans-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography». *J Chromatogr B Biomed Appl*, vol. 685, no 2, p. 233-240.
- Laplante, I., R. Beliveau et J. Paquin. 2004. «RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells». *J Neurobiol*, vol. 60, no 3, p. 289-307.
- Laplante, Isabel. 2004. *RhoA et Cdc42 : des régulateurs de la neurodétermination dans le modèle cellulaire P19*. Montréal: Université du Québec à Montréal, xv, 215 f. p.
- Le Grand, F., et M. A. Rudnicki. 2007. «Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 19, no 6, p. 628-633.
- Le May, M., H. Mach, N. Lacroix, C. Hou, J. Chen et Q. Li. 2011. «Contribution of Retinoid X Receptor Signaling to the Specification of Skeletal Muscle Lineage». *J Biol Chem*, vol. 286, no 30, p. 26806-26812.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter et et al. 1994. «A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis». *Nature*, vol. 372, no 6508, p. 739-746.
- Lepicier, P., A. Bibeau-Poirier, C. Lagneux, M. J. Servant et D. Lamontagne. 2006. «Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids». *J Pharmacol Sci*, vol. 102, no 2, p. 155-166.
- Li, X. J., Z. W. Du, E. D. Zarnowska, M. Pankratz, L. O. Hansen, R. A. Pearce et S. C. Zhang. 2005. «Specification of motoneurons from human embryonic stem cells». *Nat Biotechnol*, vol. 23, no 2, p. 215-221.

- Liao, R., O. Pfister, M. Jain et F. Mouquet. 2007. «The bone marrow--cardiac axis of myocardial regeneration». *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 50, no 1, p. 18-30.
- Liu, H., T. M. Harris, H. H. Kim et G. Childs. 2005. «Cardiac myocyte differentiation: the Nkx2.5 and Cripto target genes in P19 clone 6 cells». *Funct Integr Genomics*, vol. 5, no 4, p. 218-239.
- Lowell, B. B. 1999. «PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function». *Cell*, vol. 99, no 3, p. 239-242.
- Lund, R. D., S. Wang, I. Klimanskaya, T. Holmes, R. Ramos-Kelsey, B. Lu, S. Girman, N. Bischoff, Y. Sauve et R. Lanza. 2006. «Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats». *Cloning Stem Cells*, vol. 8, no 3, p. 189-199.
- Maioli, M., S. Santaniello, A. Montella, P. Bandiera, S. Cantoni, C. Cavallini, F. Bianchi, V. Lionetti, F. Rizzolio, I. Marchesi, L. Bagella et C. Ventura. 2010. «Hyaluronan esters drive Smad gene expression and signaling enhancing cardiogenesis in mouse embryonic and human mesenchymal stem cells». *PLoS One*, vol. 5, no 11, p. e15151.
- Makino, S., K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, J. Hata, A. Umezawa et S. Ogawa. 1999. «Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro». *J Clin Invest*, vol. 103, no 5, p. 697-705.
- Malladi, P., Y. Xu, M. Chiou, A. J. Giaccia et M. T. Longaker. 2006. «Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 290, no 4, p. C1139-1146.
- Marchal, S., I. Cassar-Malek, J. P. Magaud, J. P. Rouault, C. Wrutniak et G. Cabello. 1995. «Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the cAMP pathway». *Exp Cell Res*, vol. 220, no 1, p. 1-10.
- Mark, M., P. Kastner, N. B. Ghyselinck, W. Krezel, V. Dupe et P. Chambon. 1997. «[Genetic control of the development by retinoic acid]». *C R Seances Soc Biol Fil*, vol. 191, no 1, p. 77-90.
- Marshall, H., A. Morrison, M. Studer, H. Popperl et R. Krumlauf. 1996. «Retinoids and Hox genes». *FASEB J*, vol. 10, no 9, p. 969-978.
- Masia, S., S. Alvarez, A. R. de Lera et D. Baretino. 2007. «Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor». *Mol Endocrinol*, vol. 21, no 10, p. 2391-2402.

- Matsuura, K., T. Nagai, N. Nishigaki, T. Oyama, J. Nishi, H. Wada, M. Sano, H. Toko, H. Akazawa, T. Sato, H. Nakaya, H. Kasanuki et I. Komuro. 2004. «Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes». *J Biol Chem*, vol. 279, no 12, p. 11384-11391.
- McBurney, M. W. 1993. «P19 embryonal carcinoma cells». *Int J Dev Biol*, vol. 37, no 1, p. 135-140.
- McBurney, M. W., E. M. Jones-Villeneuve, M. K. Edwards et P. J. Anderson. 1982. «Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line». *Nature*, vol. 299, no 5879, p. 165-167.
- Michelini, L. C., M. C. Marcelo, J. Amico et M. Morris. 2003. «Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice». *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 284, no 6, p. H2269-2276.
- Michiels, C., E. Minet, G. Michel, D. Mottet, J. P. Piret et M. Raes. 2001. «HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases». *IUBMB Life*, vol. 52, no 1-2, p. 49-53.
- Miki, H., T. Yamauchi, R. Suzuki, K. Komeda, A. Tsuchida, N. Kubota, Y. Terauchi, J. Kamon, Y. Kaburagi, J. Matsui, Y. Akanuma, R. Nagai, S. Kimura, K. Tobe et T. Kadowaki. 2001. «Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation». *Mol Cell Biol*, vol. 21, no 7, p. 2521-2532.
- Minet, E., G. Michel, D. Mottet, M. Raes et C. Michiels. 2001. «Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation». *Free Radic Biol Med*, vol. 31, no 7, p. 847-855.
- Miyazono, K., S. Maeda et T. Imamura. 2005. «BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk». *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 16, no 3, p. 251-263.
- Molina, G., A. Vogt, A. Bakan, W. Dai, P. Queiroz de Oliveira, W. Znosko, T. E. Smithgall, I. Bahar, J. S. Lazo, B. W. Day et M. Tsang. 2009. «Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages». *Nat Chem Biol*, vol. 5, no 9, p. 680-687.
- Monsuez, J. J., J. C. Charniot, N. Vignat et J. Y. Artigou. 2010. «Cardiac side-effects of cancer chemotherapy». *Int J Cardiol*, vol. 144, no 1, p. 3-15.
- Monteiro, M. C., B. Wdziekonski, P. Villageois, C. Vernochet, C. Iehle, N. Billon et C. Dani. 2009. «Commitment of mouse embryonic stem cells to the adipocyte lineage requires retinoic acid receptor beta and active GSK3». *Stem Cells Dev*, vol. 18, no 3, p. 457-463.

- Moore, J. C., R. Spijker, A. C. Martens, T. de Boer, M. B. Rook, M. A. van der Heyden, L. G. Tertoolen et C. L. Mummery. 2004. «A P19Cl6 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells». *Int J Dev Biol*, vol. 48, no 1, p. 47-55.
- Morali, O. G., A. Jouneau, K. J. McLaughlin, J. P. Thiery et L. Larue. 2000. «IGF-II promotes mesoderm formation». *Dev Biol*, vol. 227, no 1, p. 133-145.
- Morkin, E. 1993. «Regulation of myosin heavy chain genes in the heart». *Circulation*, vol. 87, no 5, p. 1451-1460.
- Moss, J. B., J. Xavier-Neto, M. D. Shapiro, S. M. Nayeem, P. McCaffery, U. C. Drager et N. Rosenthal. 1998. «Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart». *Dev Biol*, vol. 199, no 1, p. 55-71.
- Mou, L., P. Lankford-Turner, M. V. Leander, R. P. Bissonnette, R. M. Donahoe et W. Royal. 2004. «RXR-induced TNF-alpha suppression is reversed by morphine in activated U937 cells». *J Neuroimmunol*, vol. 147, no 1-2, p. 99-105.
- Mukaddam-Daher, S., Y. L. Yin, J. Roy, J. Gutkowska et R. Cardinal. 2001. «Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin». *Hypertension*, vol. 38, no 2, p. 292-296.
- Murry, C. E., H. Reinecke et L. M. Pabon. 2006. «Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair». *J Am Coll Cardiol*, vol. 47, no 9, p. 1777-1785.
- Nakajima, Y., M. Sakabe, H. Matsui, H. Sakata, N. Yanagawa et T. Yamagishi. 2009. «Heart development before beating». *Anat Sci Int*, vol. 84, no 3, p. 67-76.
- Napoli, J. L. 1996. «Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction». *Clin Immunol Immunopathol*, vol. 80, no 3 Pt 2, p. S52-62.
- , 1999. «Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1440, no 2-3, p. 139-162.
- Napolitano, E. W., K. Venstrom, E. F. Wheeler et L. F. Reichardt. 1991. «Molecular cloning and characterization of B-cadherin, a novel chick cadherin». *J Cell Biol*, vol. 113, no 4, p. 893-905.
- Nezzar, H., F. Chiambaretta, G. Marceau, L. Blanchon, B. Faye, P. Dechelotte, D. Rigal et V. Sapin. 2007. «Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface». *Mol Vis*, vol. 13, p. 1641-1650.
- Nishimori, K., et M. M. Matzuk. 1996. «Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function». *Rev Reprod*, vol. 1, no 3, p. 203-212.

- Okamoto, K., H. Okazawa, A. Okuda, M. Sakai, M. Muramatsu et H. Hamada. 1990. «A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells». *Cell*, vol. 60, no 3, p. 461-472.
- Okazaki, K., et E. Maltepe. 2006. «Oxygen, epigenetics and stem cell fate». *Regen Med*, vol. 1, no 1, p. 71-83.
- Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka et S. Yamanaka. 2008. «Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors». *Science*, vol. 322, no 5903, p. 949-953.
- Olivetti, G., M. Melissari, J. M. Capasso et P. Anversa. 1991. «Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy». *Circ Res*, vol. 68, no 6, p. 1560-1568.
- OMS, Organisation mondiale de la santé. 2011. «Principales causes de décès dans le monde». En ligne. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/index.html>>. Consulté le 2011-11-15.
- Palmieri, S. L., W. Peter, H. Hess et H. R. Scholer. 1994. «Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation». *Dev Biol*, vol. 166, no 1, p. 259-267.
- Paquin, J., B. A. Danalache, M. Jankowski, S. M. McCann et J. Gutkowska. 2002. «Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no 14, p. 9550-9555.
- Pequeux, C., B. P. Keegan, M. T. Hagelstein, V. Geenen, J. J. Legros et W. G. North. 2004. «Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway». *Endocr Relat Cancer*, vol. 11, no 4, p. 871-885.
- Perino, M. G., S. Yamanaka, J. Li, A. M. Wobus et K. R. Boheler. 2008. «Cardiomyogenic stem and progenitor cell plasticity and the dissection of cardiopoiesis». *J Mol Cell Cardiol*, vol. 45, no 4, p. 475-494.
- Pignatello, M. A., F. C. Kauffman et A. A. Levin. 2002. «Liarozole markedly increases all trans-retinoic acid toxicity in mouse limb bud cell cultures: a model to explain the potency of the aromatic retinoid (E)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl] benzoic acid». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 178, no 3, p. 186-194.
- Pignatello, Michael A., Frederick C. Kauffman et Arthur A. Levin. 1997. «Multiple Factors Contribute to the Toxicity of the Aromatic Retinoid, TTNPB (Ro 13-7410): Binding

- Affinities and Disposition». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 142, no 2, p. 319-327.
- Pimienta, G., et J. Pascual. 2007. «Canonical and alternative MAPK signaling». *Cell Cycle*, vol. 6, no 21, p. 2628-2632.
- Piskunov, A., et C. Rochette-Egly. 2011. «A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK». *Oncogene*.
- Poirier, S., A. Prat, E. Marcinkiewicz, J. Paquin, B. P. Chitramuthu, D. Baranowski, B. Cadieux, H. P. Bennett et N. G. Seidah. 2006. «Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system». *J Neurochem*, vol. 98, no 3, p. 838-850.
- Price, F. D., K. Kuroda et M. A. Rudnicki. 2007. «Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1772, no 2, p. 272-283.
- Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki et J. R. Woodgett. 1991. «Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases». *Nature*, vol. 353, no 6345, p. 670-674.
- Punch, V. G., A. E. Jones et M. A. Rudnicki. 2009. «Transcriptional networks that regulate muscle stem cell function». *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, vol. 1, no 1, p. 128-140.
- Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch et R. J. Davis. 1995. «Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine». *J Biol Chem*, vol. 270, no 13, p. 7420-7426.
- Rajasingh, J., E. Bord, H. Hamada, E. Lambers, G. Qin, D. W. Losordo et R. Kishore. 2007. «STAT3-dependent mouse embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes: analysis of molecular signaling and therapeutic efficacy of cardiomyocyte precommitted mES transplantation in a mouse model of myocardial infarction». *Circ Res*, vol. 101, no 9, p. 910-918.
- Reffas, S., et W. Schlegel. 2000. «Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells». *Biochem J*, vol. 352 Pt 3, p. 701-708.
- Ren, Y., M. Y. Lee, S. Schliffke, J. Paavola, P. J. Amos, X. Ge, M. Ye, S. Zhu, G. Senyei, L. Lum, B. E. Ehrlich et Y. Qyang. 2011. «Small molecule Wnt inhibitors enhance the

- efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells». *J Mol Cell Cardiol*, vol. 51, no 3, p. 280-287.
- Ringe, J., C. Kaps, G. R. Burmester et M. Sittinger. 2002. «Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs». *Naturwissenschaften*, vol. 89, no 8, p. 338-351.
- Roberts, A. B., M. D. Nichols, D. L. Newton et M. B. Sporn. 1979. «In vitro metabolism of retinoic acid in hamster intestine and liver». *J Biol Chem*, vol. 254, no 14, p. 6296-6302.
- Rochette-Egly, C., et P. Germain. 2009. «Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs)». *Nucl Recept Signal*, vol. 7, p. e005.
- Rodriguez, E. R., C. D. Tan, U. S. Onwuta, Z. X. Yu, V. J. Ferrans et J. E. Parrillo. 1994. «3,5,3'-Triiodo-L-thyronine induces cardiac myocyte differentiation but not neuronal differentiation in P19 teratocarcinoma cells in a dose dependent manner». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 205, no 1, p. 652-658.
- Ross, S. A., P. J. McCaffery, U. C. Drager et L. M. De Luca. 2000. «Retinoids in embryonal development». *Physiol Rev*, vol. 80, no 3, p. 1021-1054.
- Rubin, M., E. Fenig, A. Rosenauer, C. Menendez-Botet, C. Achkar, J. M. Bentel, J. Yahalom, J. Mendelsohn et W. H. Miller, Jr. 1994. «9-Cis retinoic acid inhibits growth of breast cancer cells and down-regulates estrogen receptor RNA and protein». *Cancer Res*, vol. 54, no 24, p. 6549-6556.
- Rudnicki, M. A., G. Jackowski, L. Saggin et M. W. McBurney. 1990. «Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells». *Dev Biol*, vol. 138, no 2, p. 348-358.
- Rudnicki, M. A., F. Le Grand, I. McKinnell et S. Kuang. 2008. «The molecular regulation of muscle stem cell function». *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 73, p. 323-331.
- Rudnicki, M.A., et M. W. McBurney. 1987. *Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. Dans Teratocarcinomas and embryonic stem cells : a practical approach*. Coll. «Practical approach series.». Oxford: IRL, xii, 254 p.
- Ryan, T., J. Liu, A. Chu, L. Wang, A. Blais et I. S. Skerjanc. 2011. «Retinoic Acid Enhances Skeletal Myogenesis in Human Embryonic Stem Cells by Expanding the Premyogenic Progenitor Population». *Stem Cell Rev*.
- Sabourin, L. A., et M. A. Rudnicki. 2000. «The molecular regulation of myogenesis». *Clin Genet*, vol. 57, no 1, p. 16-25.

- Sapino, A., L. Macri, L. Tonda et G. Bussolati. 1993. «Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland». *Endocrinology*, vol. 133, no 2, p. 838-842.
- Sauer, H., W. Neukirchen, G. Rahimi, F. Grunheck, J. Hescheler et M. Wartenberg. 2004. «Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells». *Exp Cell Res*, vol. 294, no 2, p. 313-324.
- Schmidt, M. M., K. Guan et A. M. Wobus. 2001. «Lithium influences differentiation and tissue-specific gene expression of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro». *Int J Dev Biol*, vol. 45, no 2, p. 421-429.
- Scholer, H. R., R. Balling, A. K. Hatzopoulos, N. Suzuki et P. Gruss. 1989. «Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis». *Embo J*, vol. 8, no 9, p. 2551-2557.
- Schriefer, J. A., P. R. Lewis et J. W. Miller. 1982. «Role of fetal oxytocin in parturition in the rat». *Biol Reprod*, vol. 27, no 2, p. 362-368.
- Sessler, R. J., et N. Noy. 2005. «A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II». *Mol Cell*, vol. 18, no 3, p. 343-353.
- Shenefelt, R. E. 2010. «Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. Teratology 5:103-18. 1972». *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, vol. 88, no 10, p. 847-862.
- Shibata, R., K. Sato, D. R. Pimentel, Y. Takemura, S. Kihara, K. Ohashi, T. Funahashi, N. Ouchi et K. Walsh. 2005. «Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms». *Nat Med*, vol. 11, no 10, p. 1096-1103.
- Shibota, Y., Y. Kaneko, M. Kuroda et A. Nishikawa. 2000. «Larval-to-adult conversion of a myogenic system in the frog, *Xenopus laevis*, by larval-type myoblast-specific control of cell division, cell differentiation, and programmed cell death by triiodo-L-thyronine». *Differentiation*, vol. 66, no 4-5, p. 227-238.
- Shim, W. S., S. Jiang, P. Wong, J. Tan, Y. L. Chua, Y. S. Tan, Y. K. Sin, C. H. Lim, T. Chua, M. Teh, T. C. Liu et E. Sim. 2004. «Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 324, no 2, p. 481-488.
- Si-Tayeb, K., F. K. Noto, M. Nagaoka, J. Li, M. A. Battle, C. Duris, P. E. North, S. Dalton et S. A. Duncan. 2010. «Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells». *Hepatology*, vol. 51, no 1, p. 297-305.

- Si, Y. L., Y. L. Zhao, H. J. Hao, X. B. Fu et W. D. Han. 2011. «MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns». *Ageing Res Rev*, vol. 10, no 1, p. 93-103.
- Siu, C. W., J. C. Moore et R. A. Li. 2007. «Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for heart therapies». *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, vol. 7, no 2, p. 145-152.
- Skerjanc, I. S. 1999. «Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells». *Trends Cardiovasc Med*, vol. 9, no 5, p. 139-143.
- Skerjanc, I. S., et M. W. McBurney. 1994. «The E box is essential for activity of the cardiac actin promoter in skeletal but not in cardiac muscle». *Dev Biol*, vol. 163, no 1, p. 125-132.
- Slack, J. M. W. 2006. *Essential developmental biology*, 2nd. Malden, MA: Blackwell Pub., ix, 365 p.
- Srivastava, D., et E. N. Olson. 2000. «A genetic blueprint for cardiac development». *Nature*, vol. 407, no 6801, p. 221-226.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir et K. Hochedlinger. 2008. «Induced pluripotent stem cells generated without viral integration». *Science*, vol. 322, no 5903, p. 945-949.
- Stokoe, D., K. Engel, D. G. Campbell, P. Cohen et M. Gaestel. 1992. «Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins». *FEBS Lett*, vol. 313, no 3, p. 307-313.
- Sucov, H. M., et R. M. Evans. 1995. «Retinoic acid and retinoic acid receptors in development». *Mol Neurobiol*, vol. 10, no 2-3, p. 169-184.
- Sueblinvong, V., R. Loi, P. L. Eisenhauer, I. M. Bernstein, B. T. Suratt, J. L. Spees et D. J. Weiss. 2008. «Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells». *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 177, no 7, p. 701-711.
- Sweeney, G., R. Somwar, T. Ramlal, A. Volchuk, A. Ueyama et A. Klip. 1999. «An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes». *J Biol Chem*, vol. 274, no 15, p. 10071-10078.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda et S. Yamanaka. 2007. «Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors». *Cell*, vol. 131, no 5, p. 861-872.

- Takahashi, K., et S. Yamanaka. 2006. «Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors». *Cell*, vol. 126, no 4, p. 663-676.
- Takahashi, T., B. Lord, P. C. Schulze, R. M. Fryer, S. S. Sarang, S. R. Gullans et R. T. Lee. 2003. «Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes». *Circulation*, vol. 107, no 14, p. 1912-1916.
- Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariati, P. Cohen et M. J. Comb. 1996. «FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2». *Embo J*, vol. 15, no 17, p. 4629-4642.
- Tang, C., A. S. Lee, J. P. Volkmer, D. Sahoo, D. Nag, A. R. Mosley, M. A. Inlay, R. Ardehali, S. L. Chavez, R. R. Pera, B. Behr, J. C. Wu, I. L. Weissman et M. Drukker. 2011. «An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells». *Nat Biotechnol*.
- Tao, Z. W., et L. G. Li. 2007. «Cell therapy in congestive heart failure». *J Zhejiang Univ Sci B*, vol. 8, no 9, p. 647-660.
- Tavera-Mendoza, L. E., T. D. Quach, B. Dabbas, J. Hudon, X. Liao, A. Palijan, J. L. Gleason et J. H. White. 2008. «Incorporation of histone deacetylase inhibition into the structure of a nuclear receptor agonist». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no 24, p. 8250-8255.
- Teo, A. K., et L. Vallier. 2010. «Emerging use of stem cells in regenerative medicine». *Biochem J*, vol. 428, no 1, p. 11-23.
- Terami, H., K. Hidaka, T. Katsumata, A. Iio et T. Morisaki. 2004. «Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 325, no 3, p. 968-975.
- Tropel, P., D. Noel, N. Platet, P. Legrand, A. L. Benabid et F. Berger. 2004. «Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow». *Exp Cell Res*, vol. 295, no 2, p. 395-406.
- Tuch, B. E. 2006. «Stem cells--a clinical update». *Aust Fam Physician*, vol. 35, no 9, p. 719-721.
- van der Heyden, M. A., et L. H. Defize. 2003. «Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation». *Cardiovasc Res*, vol. 58, no 2, p. 292-302.
- van der Heyden, M. A., M. J. van Kempen, Y. Tsuji, M. B. Rook, H. J. Jongsma et T. Opthof. 2003. «P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac

- electrophysiological differentiation at the molecular and functional level». *Cardiovasc Res*, vol. 58, no 2, p. 410-422.
- van Wijk, B., A. F. Moorman et M. J. van den Hoff. 2007. «Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation». *Cardiovasc Res*, vol. 74, no 2, p. 244-255.
- Ventura, C., C. Cavallini, F. Bianchi et S. Cantoni. 2008. «Stem cells and cardiovascular repair: a role for natural and synthetic molecules harboring differentiating and paracrine logics». *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, vol. 6, no 1, p. 60-68.
- Ventura, C., et M. Maioli. 2000. «Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells». *Circ Res*, vol. 87, no 3, p. 189-194.
- Ventura, C., M. Maioli, Y. Asara, D. Santoni, I. Scarlata, S. Cantoni et A. Perbellini. 2004. «Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells». *J Biol Chem*, vol. 279, no 22, p. 23574-23579.
- Ventura, C., E. Zinellu, E. Maninchedda et M. Maioli. 2003. «Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase C activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells». *Circ Res*, vol. 92, no 6, p. 623-629.
- Vuligonda, Vidyasagar, Yuan Lin et Roshantha A. S. Chandraratna. 1996. «Synthesis of highly potent RXR-specific retinoids: The use of a cyclopropyl group as a double bond isostere». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 6, no 2, p. 213-218.
- Wagatsuma, A. 2007. «Adipogenic potential can be activated during muscle regeneration». *Mol Cell Biochem*, vol. 304, no 1-2, p. 25-33.
- Wagner, K. U., W. S. Young, 3rd, X. Liu, E. I. Ginns, M. Li, P. A. Furth et L. Hennighausen. 1997. «Oxytocin and milk removal are required for post-partum mammary-gland development». *Genes Funct*, vol. 1, no 4, p. 233-244.
- Waliszewski, P., M. Waliszewska, N. Gordon, R. E. Hurst, D. M. Benbrook, A. Dhar et G. P. Hemstreet, 3rd. 1999. «Retinoid signaling in immortalized and carcinoma-derived human uroepithelial cells». *Mol Cell Endocrinol*, vol. 148, no 1-2, p. 55-65.
- Wang, Y., W. W. Porter, N. Suh, T. Honda, G. W. Gribble, L. M. Leesnitzer, K. D. Plunket, D. J. Mangelsdorf, S. G. Blanchard, T. M. Willson et M. B. Sporn. 2000. «A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma». *Mol Endocrinol*, vol. 14, no 10, p. 1550-1556.
- White, R. J., et T. F. Schilling. 2008. «How degrading: Cyp26s in hindbrain development». *Dev Dyn*, vol. 237, no 10, p. 2775-2790.

- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe et G. L. Johnson. 1999. «Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human». *Physiol Rev*, vol. 79, no 1, p. 143-180.
- Wilson, E. J., et M. D. Hollenberg. 1987. «Effects of oxytocin and vasopressin on the preadipocyte 3T3-F442A cell line». *Biochem Cell Biol*, vol. 65, no 3, p. 211-218.
- Winslow, J. T., et T. R. Insel. 2002. «The social deficits of the oxytocin knockout mouse». *Neuropeptides*, vol. 36, no 2-3, p. 221-229.
- Wobus, Anna M. 2001. «Potential of embryonic stem cells». *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 22, no 3, p. 149-164.
- Wrzal, P. K., D. Devost, D. Petrin, E. Goupil, C. Iorio-Morin, S. A. Laporte, H. H. Zingg et T. E. Hebert. 2012a. «Allosteric interactions between the oxytocin receptor and the beta(2)-adrenergic receptor in the modulation of ERK1/2 activation are mediated by heterodimerization». *Cell Signal*, vol. 24, no 1, p. 342-350.
- Wrzal, P. K., E. Goupil, S. A. Laporte, T. E. Hebert et H. H. Zingg. 2012b. «Functional interactions between the oxytocin receptor and the beta(2)-adrenergic receptor: Implications for ERK1/2 activation in human myometrial cells». *Cell Signal*, vol. 24, no 1, p. 333-341.
- Wu, J., J. Kubota, J. Hirayama, Y. Nagai, S. Nishina, T. Yokoi, Y. Asaoka, J. Seo, N. Shimizu, H. Kajiho, T. Watanabe, N. Azuma, T. Katada et H. Nishina. 2010. «p38 Mitogen-activated protein kinase controls a switch between cardiomyocyte and neuronal commitment of murine embryonic stem cells by activating myocyte enhancer factor 2C-dependent bone morphogenetic protein 2 transcription». *Stem Cells Dev*, vol. 19, no 11, p. 1723-1734.
- Wu, S., M. Jia, Y. Ruan, J. Liu, Y. Guo, M. Shuang, X. Gong, Y. Zhang, X. Yang et D. Zhang. 2005. «Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population». *Biol Psychiatry*, vol. 58, no 1, p. 74-77.
- Wu, Z., P. J. Woodring, K. S. Bhakta, K. Tamura, F. Wen, J. R. Feramisco, M. Karin, J. Y. Wang et P. L. Puri. 2000. «p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps». *Mol Cell Biol*, vol. 20, no 11, p. 3951-3964.
- Wujcik, D. 1996. «Update on the diagnosis of and therapy for acute promyelocytic leukemia and chronic myelogenous leukemia». *Oncol Nurs Forum*, vol. 23, no 3, p. 478-487.
- Xavier-Neto, J., M. D. Shapiro, L. Houghton et N. Rosenthal. 2000. «Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart». *Dev Biol*, vol. 219, no 1, p. 129-141.

- Xu, X. Q., R. Graichen, S. Y. Soo, T. Balakrishnan, S. N. Bte Rahmat, S. Sieh, S. C. Tham, C. Freund, J. Moore, C. Mummery, A. Colman, R. Zweigerdt et B. P. Davidson. 2008. «Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells». *Differentiation*.
- Xue, J. C., E. J. Schwarz, A. Chawla et M. A. Lazar. 1996. «Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma». *Mol Cell Biol*, vol. 16, no 4, p. 1567-1575.
- Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic et R. A. Flavell. 1997. «Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene». *Nature*, vol. 389, no 6653, p. 865-870.
- Ybarra, N., J. R. del Castillo et E. Troncy. 2011. «Involvement of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in the oxytocin-mediated differentiation of porcine bone marrow stem cells into cardiomyocytes». *Nitric Oxide*, vol. 24, no 1, p. 25-33.
- Ye, L., J. C. Chang, C. Lin, X. Sun, J. Yu et Y. W. Kan. 2009. «Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no 24, p. 9826-9830.
- Yin, T., et L. Li. 2006. «The stem cell niches in bone». *J Clin Invest*, vol. 116, no 5, p. 1195-1201.
- Yoon, J., B. G. Min, Y. H. Kim, W. J. Shim, Y. M. Ro et D. S. Lim. 2005. «Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model». *Acta Cardiol*, vol. 60, no 3, p. 277-284.
- Young, W. S., 3rd, E. Shepard, A. C. DeVries, A. Zimmer, M. E. LaMarca, E. I. Ginns, J. Amico, R. J. Nelson, L. Hennighausen et K. U. Wagner. 1998. «Targeted reduction of oxytocin expression provides insights into its physiological roles». *Adv Exp Med Biol*, vol. 449, p. 231-240.
- Zetser, A., E. Gredinger et E. Bengal. 1999. «p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor». *J Biol Chem*, vol. 274, no 8, p. 5193-5200.
- Zhang, D., W. Jiang, M. Liu, X. Sui, X. Yin, S. Chen, Y. Shi et H. Deng. 2009. «Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells». *Cell Res*, vol. 19, no 4, p. 429-438.
- Zhang, W., Z. L. Deng, L. Chen, G. W. Zuo, Q. Luo, Q. Shi, B. Q. Zhang, E. R. Wagner, F. Rastegar, S. H. Kim, W. Jiang, J. Shen, E. Huang, Y. Gao, J. L. Gao, J. Z. Zhou, J. Luo, J. Huang, X. Luo, Y. Bi, Y. Su, K. Yang, H. Liu, H. H. Luu, R. C. Haydon, T.

- C. He et B. C. He. 2010. «Retinoic acids potentiate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells». *PLoS One*, vol. 5, no 7, p. e11917.
- Zile, M., W. Gaasch, W. Little, G. Francis, L. Tavazzi, J. Cleland et M. Davies. 2004. «A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled, dose comparative study of the efficacy, tolerability, and safety of MCC-135 in subjects with chronic heart failure, NYHA class II/III (MCC-135-GO1 study): rationale and design». *J Card Fail*, vol. 10, no 3, p. 193-199.
- Zile, M. H. 2001. «Function of vitamin A in vertebrate embryonic development». *J Nutr*, vol. 131, no 3, p. 705-708.
- , 2004. «Vitamin a requirement for early cardiovascular morphogenesis specification in the vertebrate embryo: insights from the avian embryo». *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 229, no 7, p. 598-606.
- Zimmermann, W. H. 2011. «Embryonic and embryonic-like stem cells in heart muscle engineering». *J Mol Cell Cardiol*, vol. 50, no 2, p. 320-326.
- zur Nieden, N. I., G. Kempka et H. J. Ahr. 2003. «In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts». *Differentiation*, vol. 71, no 1, p. 18-27.
- Zwi, L., O. Caspi, G. Arbel, I. Huber, A. Gepstein, I. H. Park et L. Gepstein. 2009. «Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells». *Circulation*, vol. 120, no 15, p. 1513-1523.

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour son mémoire ou sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans un mémoire ou une thèse sauf cas exceptionnel défini dans le Règlement no 8 de l'UQAM (Annexe A1.1).

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Ce premier manuscrit porte sur la différenciation mésodermique des cellules de carcinome embryonnaire P19. L'induction par l'acide rétinolique permet d'obtenir des adipocytes et, à des moindres niveaux, des myocytes de type cardiaque et squelettique.

La planification expérimentale, l'obtention des résultats, la recherche bibliographique ainsi que la rédaction du manuscrit furent réalisés par Frédéric Bouchard sous l'encadrement et la supervision du Dre Joanne Paquin.

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells

publié dans : **Stem Cells and Development**

Auteur principal : Frédéric Bouchard	<u>Frédéric Bouchard</u>	<u>12 janvier 2012</u>
	Signature	Date
Directeur de recherche : Joanne Paquin	<u>Joanne Paquin</u>	<u>12 jan 2012</u>
	Signature	Date

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION
D'UN ARTICLE DANS UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire sauf cas exceptionnel défini dans le Règlement no 8 de l'UQAM (Annexe A1.1).

Nous entérinons que **Frédéric Bouchard**

est l'auteur principal de l'article intitulé :

Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells.
Bouchard, F., and Paquin, J. (2009) Stem Cells Dev 18:1023-1032.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse

Co-auteur(s)

1) <u>Bouchard, Frédéric</u> Nom, prénom	<u>Frédéric Bouchard</u> Signature	<u>12 janvier 2012</u> Date
2) <u>Paquin, Joanne</u> Nom, prénom	<u>Joanne Paquin</u> Signature	<u>12 jan 2012</u> Date

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour son mémoire ou sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans un mémoire ou une thèse sauf cas exceptionnel défini dans le Règlement no 8 de l'UQAM (Annexe A1.1).

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Ce second manuscrit porte sur l'impact des rétinoïdes sur la différenciation mésodermique de cellules P19. L'agoniste des RXR (LG268) permet la différenciation adipogénique et myogénique. L'agoniste des RAR (TTNPB) permet seulement la différenciation adipogénique avec un meilleur rendement que l'AR. Les MAPK ERK et P38 sont impliquées dans cette décision mésodermique.

La planification expérimentale, l'obtention des résultats, la recherche bibliographique ainsi que la rédaction du manuscrit furent réalisés par Frédéric Bouchard sous l'encadrement et la supervision du Dre Joanne Paquin.

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

The retinoid agonists TTNPB and LG100268 differently modulate adipogenesis, myogenesis and the phosphorylation of Erk and P38 MAPK in P19 stem cells

Soumis prochainement dans : **Stem Cells and Development**

Auteur principal : **Frédéric Bouchard**

Frédéric Bouchard
Signature

12 janvier 2012
Date

Directeur de recherche : **Joanne Paquin**

Joanne Paquin
Signature

12 jan 2012
Date

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION
D'UN ARTICLE DANS UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire sauf cas exceptionnel défini dans le Règlement no 8 de l'UQAM (Annexe A1.1).

Nous entérinons que **Frédéric Bouchard**

est l'auteur principal de l'article intitulé :

The retinoid agonists TTNPB and LG100268 differently modulate adipogenesis, myogenesis and the phosphorylation of Erk and P38 MAPK in P19 stem cells. Bouchard, F., and Paquin, J. Soumis prochainement dans Stem Cells and Development.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse

Co-auteur(s)

1) <u>Bouchard, Frédéric</u>	<u>Frédéric Bouchard</u>	<u>12 janvier 2012</u>
Nom, prénom	Signature	Date

2) <u>Paquin, Joanne</u>	<u>Joanne Paquin</u>	<u>12 jan 2012</u>
Nom, prénom	Signature	Date

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour son mémoire ou sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans un mémoire ou une thèse sauf cas exceptionnel défini dans le Règlement no 8 de l'UQAM (Annexe A1:1).

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Ce troisième manuscrit porte sur la différenciation cardiaque à base d'OT de cellules P19. l'atRA module la différenciation myogénique induite par l'OT. La MAPK ERK est impliquée dans la différenciation myogénique des cellules P19 et est modulée par l'atRA et l'OT.

La planification expérimentale, l'obtention des résultats, la recherche bibliographique ainsi que la rédaction du manuscrit furent réalisés par Frédéric Bouchard sous l'encadrement et la supervision du Dre Joanne Paquin.

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

Retinoic acid and ERK signalings timely modulate the myogenic properties of oxytocin in P19 stem cells

Soumis prochainement dans : **PLoS One**

Auteur principal : **Frédéric Bouchard**

Frédéric Bouchard
Signature

12 janvier 2012
Date

Directeur de recherche : **Joanne Paquin**

Joanne Paquin
Signature

12 jan 2012
Date

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION
D'UN ARTICLE DANS UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire sauf cas exceptionnel défini dans le Règlement no 8 de l'UQAM (Annexe A1.1).

Nous entérinons que **Frédéric Bouchard**

est l'auteur principal de l'article intitulé :

Retinoic acid and ERK signalings timely modulate the myogenic properties of oxytocin in P19 stem cells. Bouchard, F., and Paquin, J. Soumis prochainement dans PLoS One.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse

Co-auteur(s)

1) Bouchard, Frédéric
Nom, prénom

Frédéric Bouchard
Signature

12 janvier 2012
Date

2) Paquin, Joanne
Nom, prénom

Joanne Paquin
Signature

12 jan 2012
Date